

MYOKARDIALE WIRKUNGEN
DES SPURENELEMENTS VANADIUM
Untersuchungen an kultivierten Herzzellen

GERHARD BAURIEDEL

—
1983
—

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774

Aus der Medizinischen Klinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Klinikum Großhadern

Direktor: Professor Dr. med. G. Riecker

MYOKARDIALE WIRKUNGEN DES SPURENELEMENTS VANADIUM

Untersuchungen an kultivierten Herzzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

GERHARD BAURIEDEL

aus München

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Erdmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Riecker

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 1. 1983



1. Die Kunst der Kunst

2. Die Kunst der Kunst

3. Die Kunst der Kunst

4. Die Kunst der Kunst

5. Die Kunst der Kunst

MEINEN GROSSELTERN

GEWIDMET

6. Die Kunst der Kunst

7. Die Kunst der Kunst

8. Die Kunst der Kunst

9. Die Kunst der Kunst

10. Die Kunst der Kunst

11. Die Kunst der Kunst

12. Die Kunst der Kunst

13. Die Kunst der Kunst

14. Die Kunst der Kunst

15. Die Kunst der Kunst

16. Die Kunst der Kunst

17. Die Kunst der Kunst

18. Die Kunst der Kunst

19. Die Kunst der Kunst



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0051

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
2. <u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	3
2.1 Präparation und Kultivierung von Herzzellen	3
2.2 Analysierung des Kontraktionsverhaltens kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen	13
2.3 Membranpotential-Ableitungen von spontan kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur	14
2.4 Messung der ($^{42}\text{K}^+$)-, ($^{22}\text{Na}^+$)-, ($^{86}\text{Rb}^+$)-, ($\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$)- und 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme in kultivierte Herzzellen	15
2.5 Zulässigkeit eines Einsatzes von $^{86}\text{Rb}^+$ als K^+ -Analogon	17
2.6 Bestimmung der zellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte	18
2.7 Inkubationsmedien und Lösungsverhalten von Insulin und Na_3VO_4	19
2.8 Präparation und Messung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität neonataler Ratten-Herzen	21
2.9 Materialien	21
2.10 Abkürzungen	22
3. <u>ANALYSIERUNG DER PHARMAKON- BZW. HORMON-WIRKUNG AUF MYOKARD-GEWEBE MIT HILFE KULTIVIERTER HERZMUSKELZELLEN</u>	23
3.1 Rezeptoren	24
3.2 Membrantransport und Ionenflüsse	25
3.3 Membranpotentiale	25
3.4 Kontraktilität	28
3.5 Zellstoffwechsel	29

4.	<u>ERGEBNISSE</u>	32
4.1	Aufnahme von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen	32
4.1.1	Charakterisierung der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme	32
4.1.2	Charakterisierung der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Anreicherung	38
4.2	Beeinflussung des Kontraktionsverhaltens kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen durch Na_3VO_4	43
4.2.1	Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionsgeschwindigkeit	43
4.2.2	Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionsfrequenz	43
4.2.3	Einfluß von Na_3VO_4 auf die Automatieneigung	45
4.2.4	Toxische Wirkungen von Na_3VO_4 bzw. g-Strophanthin auf Kontraktilität und Morphologie	47
4.2.5	Spezifität der Vanadium-Verbindungen auf die Kontraktilität	50
4.3	Einfluß von Na_3VO_4 auf den transmembranären Fluß monovalenter Kationen und die zellulären Elektrolyt-Gehalte kultivierter Herzzellen (kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen, Ratten-, Hühner- und Meerschweinchenherz-Nichtmuskelzellen und menschliche Girardi-Herzzellen)	51
4.3.1	Vergleich der Wirkungen von Na_3VO_4 und g-Strophanthin auf die ($^{42}\text{K}^+$)- bzw. ($^{86}\text{Rb}^+$)-Aufnahme verschiedener kultivierter Herzzellen	51
4.3.2	Vergleich der Wirkungen von Na_3VO_4 und g-Strophanthin auf die zellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte kultivierter Herzzellen	63
4.3.3	Wirkungen von Na_3VO_4 bzw. g-Strophanthin auf den Na^+ -Einstrom in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur	65
4.3.4	Langzeit-Wirkungen von Na_3VO_4 auf Kontraktilität, ($^{86}\text{Rb}^+$)-Aufnahme und zellulären K^+ -Gehalt in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen	69
4.4	Vergleich der Wirkungen von Insulin und Na_3VO_4 auf ($^{86}\text{Rb}^+$)-Einstrom, zellulären K^+ -Gehalt und 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme in kultivierten Herzzellen (kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen, Ratten-, Hühner- und Meerschweinchenherz-Nichtmuskelzellen und menschliche Girardi-Herzzellen)	72

	<u>Seite</u>
5. <u>DISKUSSION</u>	78
5.1 Aufnahme und Anreicherung von Na_3VO_4 in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen	78
5.1.1 Charakterisierung der Na_3VO_4 -Aufnahme	78
5.1.2 Charakterisierung der Na_3VO_4 -Anreicherung	80
5.2 Wirkung von Na_3VO_4 auf Ionenflüsse und intrazelluläre Elektrolytgehalte verschiedener Herzzelltypen	85
5.2.1 Inhibierung der K^+ -Aufnahme	85
5.2.2 Fehlende Inhibierung der K^+ -Aufnahme	86
5.2.3 Stimulierung der K^+ -Aufnahme	87
5.2.4 Hypothese der dualistischen Na_3VO_4 -Wirkung	90
5.2.5 Na_3VO_4 als endogener Regulator der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase im Myokardgewebe	92
5.3 Modifizierung des Kontraktionsverhaltens durch Na_3VO_4	93
5.3.1 Positive Chronotropie und Bathmotropie	93
5.3.2 Positive Inotropie	95
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	99
7. <u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u>	102
8. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	105

1. EINLEITUNG

Seit 200 Jahren wird die hydropische Herzinsuffizienz mit Herzglykosiden behandelt (56, 71, 181). Diese pflanzlichen Steroide zeigen am Herzmuskel eine Steigerung der Kontraktionskraft (108, 136, 164). Während der molekulare Wirkungsmechanismus der Digitalis-induzierten positiven Inotropie noch nicht endgültig geklärt ist, kann das Vorhandensein spezifischer Herzglykosid-Rezeptoren in der Zellmembran der Herzmuskelzelle als gesichert gelten (42, 115, 137).

Dieser Glykosid-Rezeptor ist als Bestandteil der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase identifiziert worden (38, 39, 40, 41) - eines in der Zellmembran lokalisierten Enzyms, das energieabhängig K^+ -Ionen in und Na^+ -Ionen aus der Zelle transportiert und damit das biochemische Äquivalent der Na^+ -Pumpe darstellt (156, 157).

Als einziges experimentell abgesichertes Resultat einer Interaktion von Herzglykosiden mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase wird derzeit die Hemmung der Na^+ -Pumpe angesehen (143, 149). Der Herzglykosid-Rezeptor zeigt eine hohe Spezifität gegenüber seinen Liganden (Überblick bei (51)); bereits bei geringfügiger Modifizierung der Digitalis-Moleküle werden ausgeprägte Affinitätsänderungen beobachtet (Überblick bei (3)).

Angesichts der Existenz solcher hochspezifischer Bindungsstellen für körperfremde, exogen applizierte Digitalis-Verbindungen ist man geneigt, an das Vorhandensein eines körpereigenen, "endogenen Glykosids" zu glauben. Trotz intensiver Suche konnte jedoch dieses postulierte endogene Glykosid bisher noch nicht identifiziert werden. Von dieser Verbindung wäre zu fordern, daß sie positiv inotrop wirkt, die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase hemmt und Herzglykoside aus ihren Bindungsstellen verdrängt.

Das essentielle Spurenelement Vanadium (86, 147, 151) erfüllt zumindest einige dieser Voraussetzungen: Es wirkt am Katzen-Papillarmuskel positiv inotrop (73, 145) und hemmt in mit $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase-angereicherten Membranpräparationen die Enzymaktivität (21, 68, 124). Ausgangspunkt dieser Befunde war die Beobachtung, daß aus Pferdemuskel isoliertes ATP eine Verunreinigung enthielt, die bereits in geringsten Konzentrationen die Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase reduzierte (7, 8, 19, 24).

Diese Verunreinigung erwies sich später als Vanadat, das damit als endogener Regulator der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase diskutiert wurde (19, 21, 48, 154).

Die Vanadat-induzierte Inhibierung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase konnte jedoch bisher nur für Membran-Homogenate demonstriert und nicht - etwa gleichzeitig mit dem positiv inotropen Effekt - an der intakten Myokardzelle nachgewiesen werden. Dies muß allerdings gefordert werden, wenn man die positiv inotrope Wirkung des Vanadats auf die Glykosid-ähnliche Regulation der Na^+ -Pumpe zurückführen will.

Ziel dieser Arbeit ist es, an kultivierten Herzzellen gleichzeitig Kontraktilität und transmembranären $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Transport auf ihre Beeinflußbarkeit durch Vanadium zu untersuchen und aufgrund der Resultate dieser Studien zu neuen, fundierteren Aussagen über den Wirkungsmechanismus von Vanadium-Verbindungen im Myokardgewebe zu kommen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

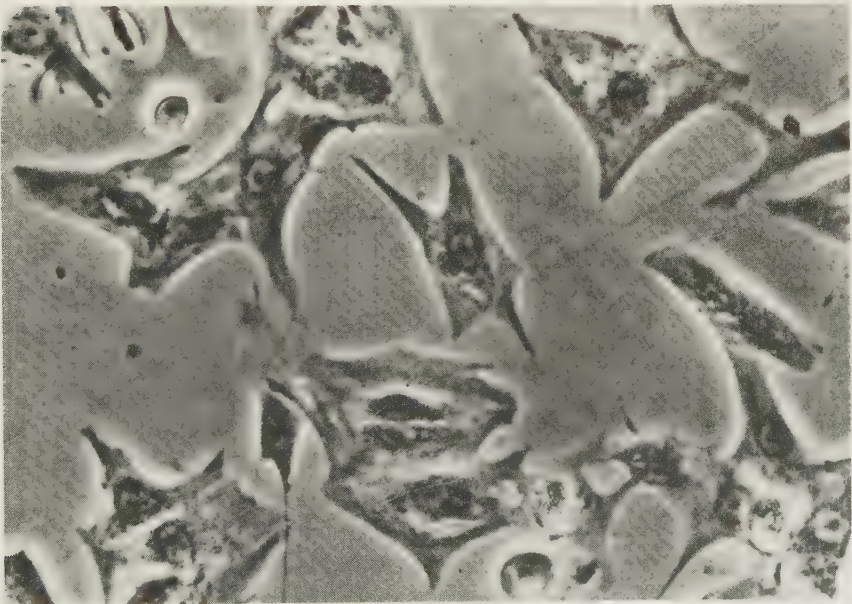
2.1 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG VON HERZZELLEN

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden mit Herzzellen unterschiedlicher Art und Spezies durchgeführt:

- a) Muskelzellen und fibroblastoide Zellen aus den Herzen neonataler Ratten (bis 5 Tage alt) (Abb. 1)
- b) Fibroblastoide Zellen aus den Herzen von Hühner-Embryonen (9 - 11 Tage alt) (Abb. 5)
- c) Fibroblastoide Zellen aus den Herzen neonataler Meerschweinchen (bis 1 Tag alt)

Abb. 1

Spontan kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur (300fache Vergrößerung im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop)



Deutlich sind die Zellkerne mit Nukleoli und die vor allem perinukleär liegenden Mitochondrien zu erkennen.

d) Menschliche Girardi-Zellen (Abb. 6), eine transformierte, epitheloid wachsende Zelllinie aus menschlichem Vorhofgewebe (64), erworben als 525. Passage von der Firma Flow Labs., D 5300 Bonn.

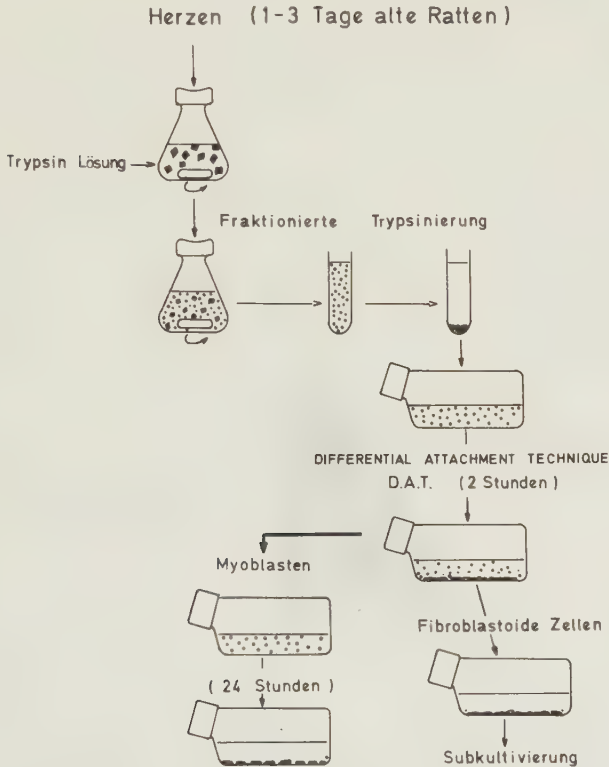
Alle Herzzellen, die nicht mit Sarkomeren ausgestattet sind, also hauptsächlich Fibroblasten und Endothelzellen (14), werden im englischen Schrifttum als "heart non muscle cells" bezeichnet; in dieser Arbeit werden die Begriffe "Herz-Nicht-muskel-Zellen" und "fibroblastoide Herzzellen" gewählt.

Der Verlauf einer Präparation folgt weitgehend der von Harary und Mitarbeitern (81) beschriebenen Methodik und soll exemplarisch am Beispiel einer Ratten-Herzmuskelzellen-Primärkultur geschildert werden (Abb. 2):

Unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) werden 15 - 100 neonatale Wistar-Ratten (0 - 5 Tage alt) dekapitiert. Nach Eröffnung des Thoraxraumes löst man die noch schlagenden Herzen aus ihrem Situs heraus und gibt sie in eiskalte (4°C) PBSAG (siehe 2.7), um das Gewebe von Blutresten zu befreien. Dann werden die herauspräparierten Herzen - ohne die Ventrikel von den Vorhöfen zu trennen - in kleinste (1 mm Kantenlänge) Gewebestücke geschnitten und durch wiederholte "Trypsinierungen" in Einzelzellen aufgelöst (Abb. 2). Unter "Trypsinierung" versteht man die Zugabe eines Trypsin (0,12 %)-Collagenase (0,03 %)-Gemisches (gelöst in PBSAG) bei einer Einwirkdauer von jeweils 15 min. bei 37°C (Temperatur-Optimum). Die aus den ersten drei Trypsinierungsschritten gewonnen Zellsuspensionen werden verworfen, denn sie enthalten einen relativ hohen Prozentsatz an Zellfragmenten, Erythrozyten sowie mesenchymalen Zellen (14). Die nachfolgenden Überstände (jeweils etwa 15 - 20 ml) gibt man in Zentrifugenröhrchen, die bereits je 1 ml eiskaltes (4°C) Wachstums-Medium (siehe 2.7) enthalten. Durch den Serumgehalt des Mediums wird die enzymatische Wirkung des Trypsins neutralisiert. Dann werden die gesammelten Zellsuspensionen abzentrifugiert (für 10 min. bei $300 \times g$), die Überstände verworfen und die Sedimente mit frischem, 37°C -warmen Wachstumsmedium wieder in Suspension gebracht (Abb. 2). Die resultierende Zell-Suspension wird in mehrere Plastik-

Abb. 2

Präparation von Ratten-Herzmuskelzellen
(schematische Darstellung)

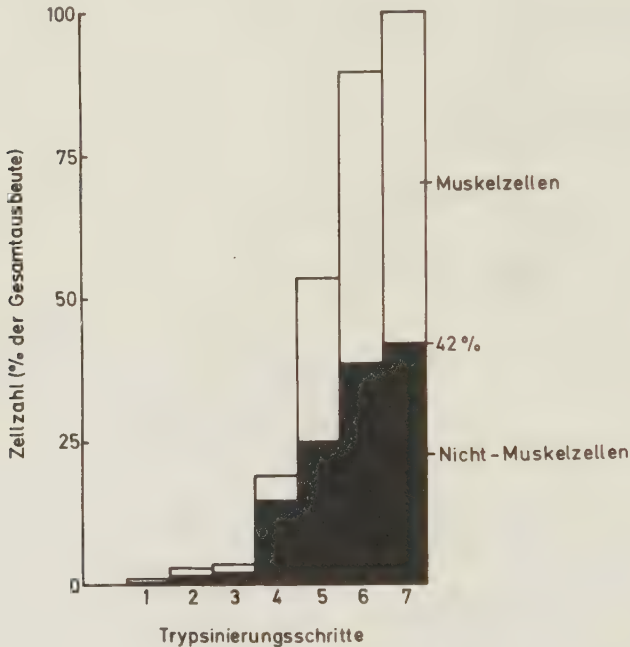


Ergänzende Erläuterungen siehe unter 2.1.

Kulturflaschen (Nuncloplastiks, DK-Roskilde, Dänemark) gegeben (Einsaatdichte ca. $2 \times 10^5/\text{cm}^2$) und für etwa 2 Stunden in einer mit Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37°C inkubiert (Heinicke-Napco-Brutschrank) (Abb. 2). Während dieser Zeit sinken fast alle fibroblastoiden Zellen - das sind etwa 20 - 30 % der Zellen des gesamten Herzens (vgl. Abb. 3) - auf den Flaschengrund herab, gewinnen allmählich Bodenkontakt und breiten sich auf ihrer Unterlage aus unter Aufgabe ihrer sphärischen Gestalt (Abb. 2). Im Gegensatz dazu flottieren die

Abb. 3

Ausbeute an Muskel- und Nicht-Muskelzellen in den Trypsinierungsschritten einer Ratten-Herzmuskelzell-Präparation (kumulierte relative Häufigkeit)



Präparation von 10 Ratten-Herzen (7 Tage alt) nach der unter 2.1 beschriebenen Methodik, mit dem Unterschied, daß hier das gewonnene Zellmaterial nicht gepoolt, sondern nach einzelnen Trypsinierungsschritten aufgetrennt dem DAT zugeführt wurde. 2 Stunden später erfolgte die Auszählung der am Flaschenboden ausgebreiteten Nicht-Muskelzellen; die Zellzahl der im dekantierten Überstand flottierenden Herzzellen - idealisiert ausschließlich myokardiale Zellen - wurde mit Hilfe eines Häemocytometers bestimmt.

Die Abbildung zeigt, daß mindestens 30 min. Einwirkzeit des Trypsin-Collagenase-Gemisches zur Aufschließung des Gewebes notwendig sind (das Zellmaterial der ersten 2 - 3 Trypsinierungsschritte wird auch normalerweise verworfen). Weitere Trypsinierung führt zu einem steilen Anstieg der Anzahl disaggregierter Zellen; im 5. und 6. Trypsinierungsschritt ist die relative Ausbeute an Muskelzellen am größten, um mit noch längerer Enzym-Einwirkdauer wieder abzufallen. Verwendet man die Herzen jüngerer (knapp 3 Tage alter) Ratten, sinkt der Anteil fibroblastoider Herzzellen auf 22 ± 5 % der Gesamtzellzahl ab ($m \pm S.E.M.$, $n=6$).

Myokardzellen noch nach Ablauf der 2stündigen Inkubation in den Überständen (Abb. 2) (14, 95). Dieser Mechanismus, das anfänglich heterogene Zellmaterial zu trennen, wird als "differential attachment technique", kurz "DAT", bezeichnet (14, 95). Mit Hilfe eines Hämocytometers bestimmt man unter dem Phasenkontrast-Mikroskop die Gesamtzellzahl der in einem Becherglas gesammelten Überstände. Durch Zugabe von zusätzlichem Wachstumsmedium wird die gewünschte Zell-Konzentration eingestellt. Die so erhaltene Zell-Suspension verteilt man dann auf 25 cm² Plastik-Kulturflaschen (Nuncclon Plastiks, DK-Roskilde, Dänemark), 5 ml Suspension pro Flasche bei einer Einsaatdichte von 1×10^4 - 1×10^5 Zellen/cm². Die weitere Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre. Auf eine Inkubation der Zellen in 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre kann verzichtet werden, da CMRL 1415 ATM eine hohe Puffer-Kapazität aufweist (82).

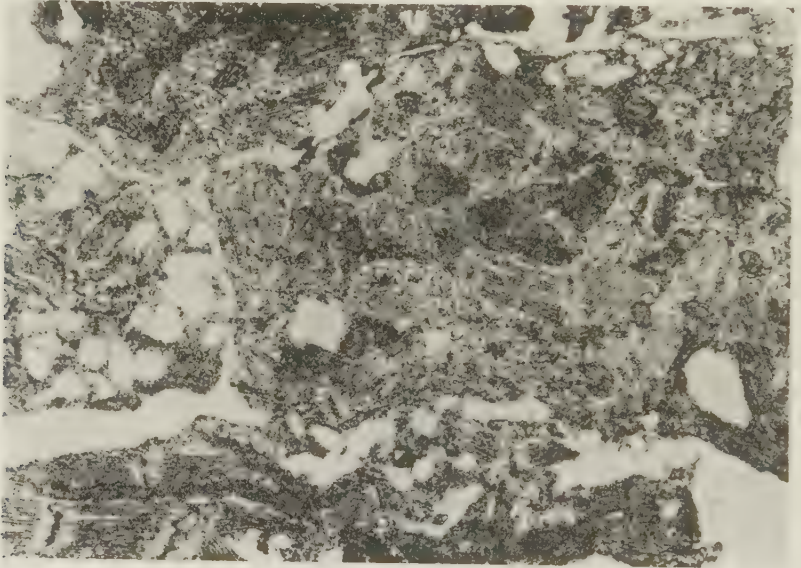
Bereits 12 - 24 Stunden nach Einsaat beobachtet man erste rhythmische Kontraktionen der kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen, die - wie oben bereits für fibroblastoide Herzzellen geschildert - Bodenkontakt gewonnen und sich auf dem Flaschengrund ausgebreitet haben (Abb. 2). Abb. 1 zeigt in 300facher Vergrößerung solche kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen, die aus den Herzen 1 - 3 Tage alter Tiere gewonnen wurden. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Abb. 4 c demonstriert für kultivierte Herzmuskelzellen die Intaktheit des kontraktilen Apparates aufgrund morphologischer Kriterien; ein Befund, der durch die spontanen Kontraktionen dieser Zellen nachdrücklich bestätigt wird. Somit sind die durch enzymatische Andauung des Herzmuskelgewebes verursachten Schädigungen reversibel. Trypsin, das teilweise ins Zellinnere einzudringen vermag (95), führt bekanntermaßen zu einer Auflösung der Sarkomerenstruktur (Abb. 4 a und b) (vgl. (54, 94, 114)). Die gezeigten Befunde sprechen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Kasten (95) für eine Regenerationszeit von weniger als 15 Stunden zur Ausbildung neuer, intakter Myofibrillen.

Ratten-Herzmuskelzellen, die nach der oben skizzierten Präparationsmethode kultiviert worden waren, konnten bei regelmäßiger Erneuerung des Züchtungsmediums mehrere Wochen bis

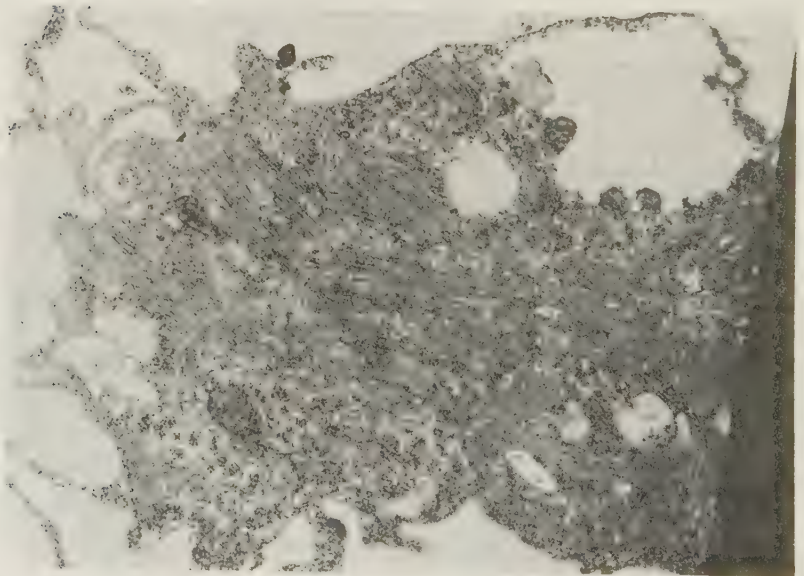
Abb. 4

Verschiedene Präparations- und Kultivierungs-Stadien kontrahierender Herzmuskelzellen (Elektronenmikroskopische Aufnahmen)

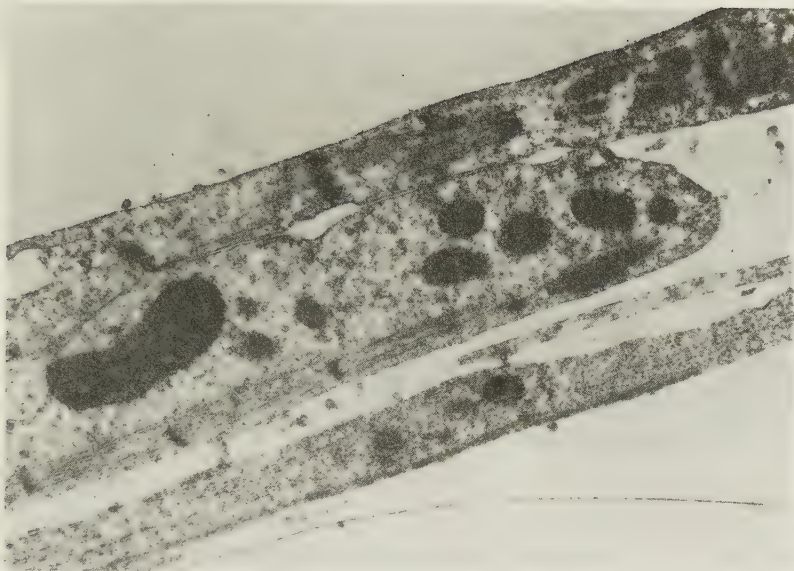
(a)



(b)



(C)



- a): Präparation; beginnende Trypsin-Einwirkung
(16.000fache Vergrößerung)
- b): Präparation; unmittelbar nach Trypsin-Einwirkung
(30.000fache Vergrößerung)
- c): Kultivierung; 48 Std. nach Präparationsbeginn
(25.000fache Vergrößerung)

Präparations- und Kultivierungs-Parameter: 7 - 10 Tage alte embryonale Hühner-Herzen; Einwirkung von 0,25 % Trypsin ohne EDTA; Kultivierung in Earle's MEM mit Bikarbonat-Puffer; Mediumwechsel alle 24 Std.

- ad a): Rechts von der Bildmitte sieht man eine große Zelle, die über Desmosomen mit Nachbarzellen verbunden ist. Gut zu erkennen sind die teilweise noch intakten Myofibrillen mit regelmäßiger Sarkomeren-Struktur und Z-Streifen und parallel angeordneten Mitochondrien (Mitte rechts und linker unterer Bildrand). Gleichzeitig wird eine beginnende, über fast alle Zellareale disseminierte Auflösung der Sarkomeren-Anordnung mit ungerichtet verlaufenden Myofilament-Bündeln beobachtet.
- ad b): Durch die Trypsin-induzierte Lösung von Interzellularbrücken werden hier keine Desmosomen mehr gefunden. Myofibrillen mit Sarkomerenstruktur, Z-Streifen und I-Banden sind ebenfalls nicht mehr zu erkennen; die Myofilamente liegen in Haufen wirr durcheinander. In

diesem Stadium ist die Zelle verständlicherweise zu einer gerichteten Kontraktion nicht mehr fähig.

ad c): Man sieht zwei im Längsschnitt getroffene, gut ausgebreitete Herzmuskelzellausläufer, einer davon besonders reich an Mitochondrien; darunter befindet sich ein ebenfalls längs getroffener Fibroblast. Die Myofilamente der Herzmuskelzelle erscheinen wieder zu typischen Myofibrillen geordnet; eine breite, regelmäßige Sarkomerenstruktur mit dunklen Z-Streifen und hellen I-Banden ist gut zu erkennen (Mitte oben und rechts). Die für eine Trypsinschädigung typische Desaggregation der kontraktiven Elemente ist nicht mehr nachweisbar. Die enge räumliche Beziehung zwischen Z-Streifen und Desmosomen läßt auf die Existenz sogenannter Glanzstreifen (Mitte oben) schließen.

(Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. K. Lehner, Anatomisches Institut der Universität Regensburg (Dir. Prof. Dr. Lindner) überlassen)

Monate am Leben erhalten werden (vgl. (79, 95)). Dabei durchliefen einzelne Zellen noch bis zu 4 Zellteilungen, ohne daß ihre Fähigkeit zu spontanen Kontraktionen verloren ging (vgl. (23)).

Die experimentellen Studien wurden nach einer Kultivierungsdauer von 2 - 5 Tagen durchgeführt, nachdem sich die Versuchsergebnisse unbeeinflusst von der Anzahl der Tage zeigten, die die Zellen in Wachstumsmedium kultiviert worden waren (Experimente nicht gezeigt).

Während dieser Zeit hat sich - abhängig von der anfänglich gewählten Einsaatdichte der Zellen - entweder eine synchron kontrahierende einschichtige Zelllage von Herzmuskelzellen gebildet oder die Zellen liegen isoliert bzw. in kleinen Sprengeln von 2 - 5 Zellen. Kulturen mit einzeln liegenden Herzmuskelzellen wurden vorzugsweise für Experimente verwendet, in denen die Kontraktionstätigkeit, z. B. Kontraktionsfrequenz oder Automatieneigung (gemessen als Zahl der schlagenden Zellen/cm²), charakterisiert wurde.

Als Qualitätskontrolle wurde kurz vor Beginn jeder Studie mit Herzmuskelzellen der Anteil kontrahierender Zellen an der Gesamtkultur bestimmt. Alle dargestellten Experimente wurden mit Zellpräparationen durchgeführt, deren Prozentsatz an schlagenden Zellen mindestens 80 % der Gesamt-Zellpopulation

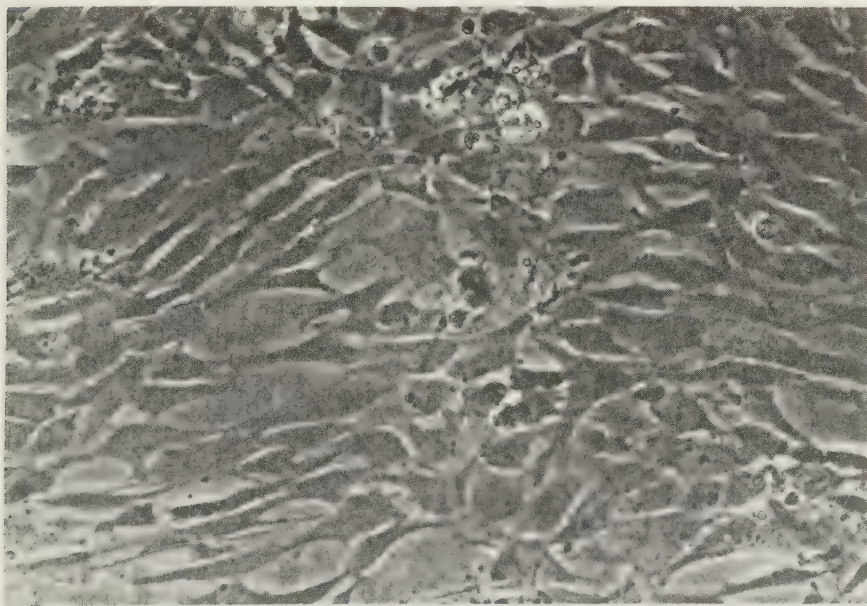
ausmachte. Dabei muß der Prozentsatz an Muskelzellen sogar noch höher als der der kontrahierenden Zellen angesetzt werden, da jede Kultur einen bestimmten Anteil an ruhenden, nicht spontan depolarisierenden Myokard-Zellen enthält (96) (vgl. Abb. 9 und 16).

Neben kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen wurden weitere Zellarten verschiedener Spezies kultiviert:

Fibroblastoide Herzzellen von Ratten, Hühnern (Abb. 5) und Meerschweinchen konnten ebenfalls über die oben skizzierte Präparationsmethode gewonnen werden, wobei die Nicht-Muskelzellen von den myokardialen Zellen des Überstandes nach Ablauf der "DAT"-Zeit getrennt und in Wachstumsmedium ohne Pferdeserum weitergezüchtet wurden. Bei konfluentem Zellrasen verwendete man die Kultur entweder für experimentelle Untersu-

Abb. 5

Kultivierte Hühnerherz-Nichtmuskelzellen (300fache Vergrößerung im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop)

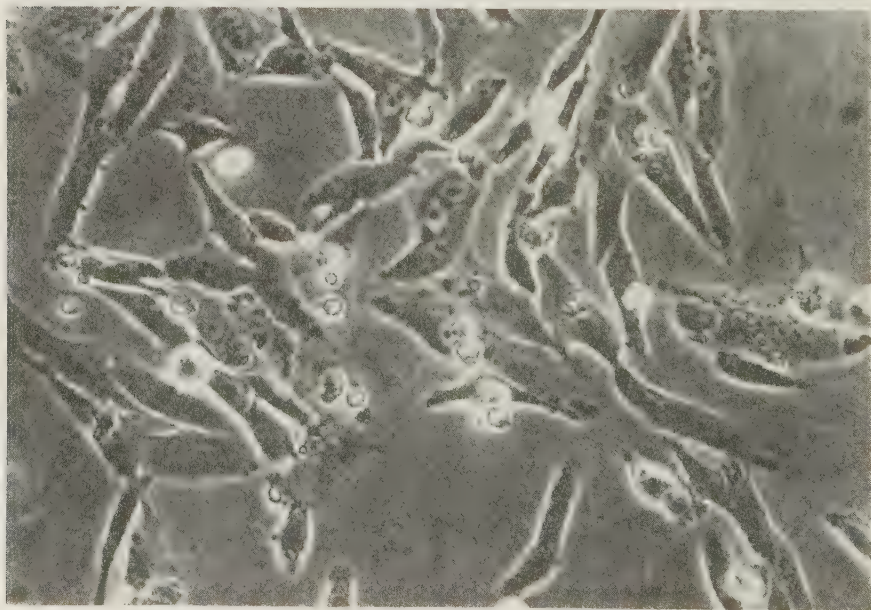


chungen oder zur Weiterzucht. Subkultivierungen (bis zu 8 in Serie) geschahen durch 2maliges Spülen der Zellen mit PBSAG und nachfolgende, etwa 15minütige Inkubation in 0,1 mM EDTA + 0,15 % Trypsin (in PBSAG). In dieser Zeit hatte sich die Mehrzahl der Zellen abgerundet und vom Flaschenboden gelöst. Nach Abzentrifugieren und Aufspülen in frischem Wachstumsmediums (ohne Pferdeserum) wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 3 auf neue Kulturflächen verteilt (Splitten).

Kulturen menschlicher Girardi-Herzzellen (Abb. 6), einer epitheloid wachsenden Zelllinie aus menschlichem Vorhofgewebe (64), wurden als 525. Passage erworben und nach derselben Methodik wie oben für fibroblastoide Herzzellen beschrieben in Wachstumsmedium ohne Pferdeserum weitergezüchtet. Dabei wurden einzelne Kulturen bis zu 15mal gesplittet; die Experimente wurden auch hier nur mit konfluenten Zellrasen durchgeführt.

Abb. 6

Menschliche Girardi-Herzzellen in Kultur (300fache Vergrößerung im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop)



2.2 ANALYSIERUNG DES KONTRAKTIONSVERHALTENS KULTIVierter RATTEN-HERZMUSKELZELLEN

Das Kontraktionsverhalten kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen wurde durch Auswertung der 3 Meßparameter Schlagfrequenz, Pulsationsamplitude sowie deren 1. Ableitung oder Anstiegsgeschwindigkeit der Kontraktion analysiert. Zur Registrierung dieser Effekte diente ein spezielles elektrooptisches System (15, 96, 97):

Kurz zusammengefaßt, wird das Bild einer schlagenden Herzmuskelzelle durch ein umgekehrtes Phasenkontrast-Mikroskop (Leitz Diavert) vergrößert (bis zu 300fach), die visuelle Information dann über eine eingebaute Fernsehkamera (Grundig FA 70 B) auf den Bildschirm eines Monitors (Grundig BG 23 T) gebracht und gleichzeitig durch einen Videorecorder (Grundig BK 3000 Color) auf Band gespeichert (Abb. 7). Phasenkontrast-Mikroskop und Fernsehkamera sind in einem Inkubationsgehäuse eingebaut, dessen Innentemperatur durch einen Thermostaten konstant bei 37°C gehalten wird (Abb. 7). Mit Hilfe der beschriebenen Apparatur kann man bis zu 25 voneinander unabhängig schlagende Herzmuskelzellen unter identischen Bedingungen in ein und demselben Experiment untersuchen.

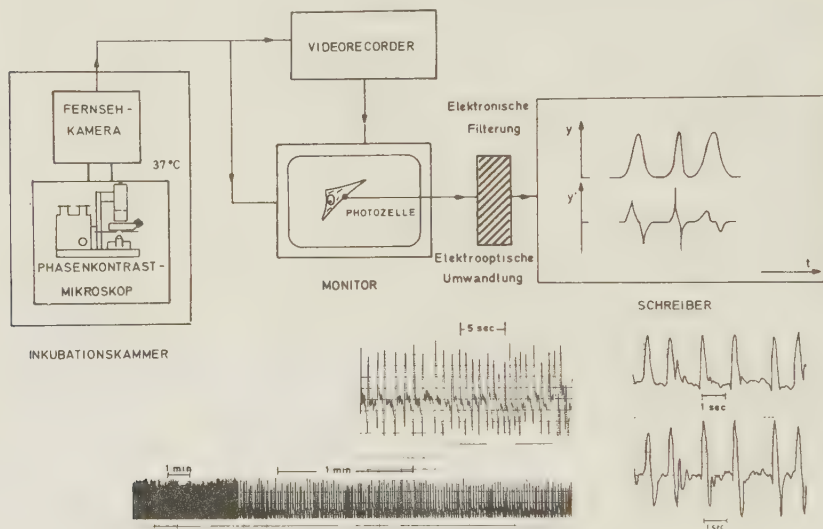
Der Kontrast zwischen dem dunklen Zelleib und dem hellen Bildschirmhintergrund wird zur Registrierung des Kontraktionsablaufs benutzt: Bei einer Kontraktion wandert die Zelle unter einer aufgesteckten Photozelle (BPY 61 Siemens) vorüber, so daß die Bewegungen des Zellrandes im Rhythmus der Kontraktionen als Zu- und Abnahme an Lichtintensität registriert werden können. Diese periodischen Lichtintensitätsverschiebungen werden dann verstärkt, elektronisch gefiltert und schließlich als Spannungsänderungen mit einem Schreiber (Hellige Mehrkanal-Schnellschreiber) festgehalten (Abb. 7).

Über einen differenzierenden Vorverstärker (155) kann die Anstiegsgeschwindigkeit der Kontraktion (dm/dt) bestimmt werden (Abb. 7), die bei der Arbeit mit kontrahierenden Herzmuskelzellen in Kultur als Maß für den positiv inotropen Effekt gilt (76).

In Abb. 7 sind mehrere Originalregistrierungen mit unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten wiedergegeben. Am rechten unteren

Abb. 7

Elektrooptisches System zur Registrierung von Kontraktionen kultivierter Herzmuskelzellen (schematische Darstellung)



Ergänzende Erläuterungen siehe im Text.

Bildrand sieht man ebenfalls eine Aufzeichnung der Kontraktion mit dazugehöriger Messung der Kontraktionsgeschwindigkeit in Form der 1. Ableitung der obigen Kurve.

2.3 MEMBRANPOTENTIAL-ABLEITUNGEN VON SPONTAN KONTRAHIERENDEN RATTEN-HERZMUSKELZELLEN IN KULTUR

Die Messung von Membranpotentialen erfolgte nach Standardverfahren (vgl. (4, 96, 102, 118)).

Kurz zusammengefaßt, wird ein Glasplättchen ($r = 1,6 \text{ cm}$), das mit spontan kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen beschichtet ist, in eine maßgefertigte Perfusionskammer dergestalt eingelassen, daß es den Boden eines offenen Bades darstellt und die Beobachtung der Zellen via Mikroskop (siehe 2.2) wei-

ter gewährleistet ist. Für einen Pulsations-freien, ständigen Medium (HeS)-Wechsel sorgt eine Pumpe (Ismatec pump 10); die Temperatur wird durch einen Wärmeaustauscher konstant bei 37°C gehalten (vgl. (101)).

Die Ableitung der elektrischen Zellaktivität geschieht mittels einer am Mikromanipulatorarm befestigten Mikroelektrode (Spitzendurchmesser etwa 0,3 μ , gefüllt mit 3 M KCl, Elektrodenwiderstand 5 - 15 M Ω). Dabei werden die Mikroelektroden mit Hilfe eines 3 D-hydraulischen Handmikrotriebs (Narishige) in den Zelleib eingeführt. Die Vorverstärkung der abgeleiteten Signale erfolgt durch ein Dagan 8100 Single Electrode System; die Aktionspotentiale werden mittels eines Tektronix 5103 N-Oszilloskops zur Darstellung gebracht.

Alle elektrophysiologischen Studien, die in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. B. Koidl, Institut für Medizinische Physik und Biophysik (Dir. Prof. Dr. H. A. Tritthart) der Universität Graz, Österreich.

2.4 MESSUNG DER ($^{42}\text{K}^+$)-, ($^{22}\text{Na}^+$)-, ($^{86}\text{Rb}^+$)-, ($\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$)- UND 2-deoxy-D-(^3H)-GLUKOSE-AUFNAHME IN KULTIVIERTE HERZ- ZELLEN

Alle Messungen wurden - soweit nicht anders bezeichnet - bei 37°C mit Herzzellen in 25 cm² Plastik-Kulturfläschchen mit HeS als Inkubationsmedium durchgeführt. Vor jedem Experiment wurde das Züchtungsmedium abgesaugt, die Kulturen 3mal mit Waschlösung (37°C) gespült und für 60 min. inkubiert in 3,5 - 5 ml HeS (+/- Na_3VO_4 , g-Strophanthin etc.) pro Flasche. Unter bestimmten Bedingungen wurde mit längeren Inkubationszeiten gearbeitet; dies ist dann in den Legenden der entsprechenden Abbildungen bzw. Tabellen ausdrücklich vermerkt.

Das Aufnahme-Experiment wurde gestartet durch Zugabe des Inkubationsmediums (HeS +/- Pharmakon) in Kombination mit dem Tracer ($^{22}\text{Na}^+$), ($^{42}\text{K}^+$), ($\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$) bzw. ($^{86}\text{Rb}^+$) oder durch Zugabe der radioaktiven Verbindung alleine. Bei Experimenten, in denen die Aufnahme von 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose bestimmt wurde,

erfolgte die Vorinkubation der Zellen wie üblich in HeS (mit 10 mM D-Glukose). Während der Messung des Aufnahmeprozesses wurde jedoch eine modifizierte Inkubationslösung verwendet, in der D-Glukose weggelassen und durch 100 μ M 2-deoxy-D-Glukose ersetzt worden war. Die Menge an eingesetzter Radioaktivität ist in der Legende der jeweiligen Abbildung bzw. Tabelle angegeben.

Der Aufnahmeprozeß wurde gestoppt durch Absaugen des radioaktiv markierten Inkubationsmediums und nachfolgendes 3maliges Spülen mit je 5 ml eiskalter (4°C) Waschlösung pro Fläschchen. Der gesamte Waschvorgang dauerte dabei weniger als 20 sec.. Diese Zeit reicht aus, die extrazelluläre Radioaktivität gründlich zu entfernen, ohne daß zellulär gebundener Tracer weggespült wird (siehe unten). Die gewaschenen Zellrasen wurden dann in 1 ml Zell-Detergenz (0,1 M NaOH + 4,5 mM EDTA) aufgelöst. 700 μ l davon wurden zur Radioaktivitätsmessung in ein Szintillations-Röhrchen (Zinsser, D 6000 Frankfurt) pipettiert, mit 1 M HCl neutralisiert und in 10 ml Unisolve (Zinsser) aufgeschwemmt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Berthold-Frieseke-Flüssigkeits-Szintillationszähler (Berthold-Frieseke, D 8000 München). 2 x 50 μ l wurden abgenommen für die Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry (111). Die Abweichung des Proteingehaltes pro Flasche innerhalb eines Experimentes war $\leq \pm 7\%$.

Zur Bestimmung der Aufnahmezeiten für $^{86}\text{Rb}^+$, $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$, $^{42}\text{K}^+$, $^{22}\text{Na}^+$ und 2-deoxy-D- (^3H) -Glukose wurden die Zellen für 60 sec. (bei $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$) bzw. 10 min. mit dem jeweiligen Tracer inkubiert. Die Aufnahmezeit errechnet sich aus der Differenz zweier Meßwerte, die beide im linearen Bereich des Aufnahmeprozesses liegen; so wurde bei jedem Experiment die Differenz aus der aufgenommenen Radioaktivität zum Zeitpunkt 10 min. bzw. 60 sec. (bei $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$) und einem sogenannten Nullwert bestimmt. Bei letzterem Wert hatten die Zellen weniger als 10 sec. lang Kontakt mit der radioaktiven Inkubationslösung und wurden anschließend - wie bereits oben ausführlich geschildert - gespült und weiter aufgearbeitet.

Die Berechnung des Betrages der jeweiligen Aufnahmezeit bzw. des zellulären Gehaltes an $^{86}\text{Rb}^+$, $^{42}\text{K}^+$ bzw. $^{22}\text{Na}^+$ erfolgt

dann über die spezifische Radioaktivität (siehe Legenden der einzelnen Abbildungen).

Zur Bestimmung des Extrazellulärspaces wurden die Zellen mit Inulin-(^{14}C)-Carboxylsäure inkubiert. Dieser Tracer vermag weder in kultivierte Herzzellen einzudringen noch an zelluläre Strukturen zu binden (vgl. (118)). Aus der nicht auswaschbaren, an die Zellen gebundenen ^{14}C -Aktivität läßt sich die Größe des Extrazellulärspaces des Zellrasens bestimmen (118). Die Inulin-(^{14}C)-Carboxylsäure verteilt sich dabei sehr rasch im Interzellulärraum; ein Gleichgewicht ist in weniger als 30 sec. erreicht (Experimente nicht gezeigt). Bei einem Zellrasen von 25 cm² Fläche (ca. 1×10^6 Ratten-Herzmuskelzellen) beträgt das Zellvolumen 2,6 µl (siehe Legende der Tab. 3), der mit radioaktivem Inulin bestimmte Extrazellulärraum dagegen 0,13 µl, das sind etwa 5 % des Intrazellulärspaces (Experimente nicht gezeigt). Vergleicht man Extrazellulärraum und "Nullwert" im jeweiligen Experiment, beobachtet man eine gute Übereinstimmung beider Größen.

2.5 ZULÄSSIGKEIT EINES EINSATZES VON $^{86}\text{Rb}^+$ ALS K^+ -ANALOGON

Zur Messung des K^+ -Flusses können $^{42}\text{K}^+$ oder $^{86}\text{Rb}^+$ verwendet werden, denn Rb^+ -Ionen zeigen bei Transportprozessen über die Zellmembran ein ähnliches Verhalten wie K^+ -Ionen (36, 99, 110). Dies konnte für Herzmuskelgewebe (122, 183), Herzmuskelzellen in Kultur (35, 117) und eine ganze Reihe weiterer Zellarten (20, 100, 159) demonstriert werden. $^{86}\text{Rb}^+$ ($T_{1/2} = 18,7$ d) besitzt gegenüber $^{42}\text{K}^+$ ($T_{1/2} = 12,5$ h) den Vorteil einer längeren Halbwertszeit und wird aus meßtechnischen Gründen bevorzugt. Um die Zulässigkeit eines Einsatzes von $^{86}\text{Rb}^+$ als K^+ -Analogon zu prüfen, wurden mehrere Experimente durchgeführt: Die K^+ -Konzentration der Inkubationslösung (5,4 mM) wird mit $^{42}\text{K}^+$ bzw. mit $^{86}\text{Rb}^+$ markiert. Nachdem sich bei kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen die Aufnahme beider Tracer über einen Zeitraum von mindestens 15 min. als linear erweist (Experiment nicht gezeigt), wird nach einer Einstromzeit von 10 min. die zellulär gebundene Radioaktivität gemessen; Temp. = 37°C.

Bei Annahme einer Ersetzbarkeit von K^+ durch Rb^+ und bei zusätzlicher Berücksichtigung der tatsächlich vorhandenen Menge an K^+ -Ionen im Medium, können über die spezifische Aktivität Influxraten in nMole ($^{42}K^+ + K^+$)/mg Protein x min. für $^{42}K^+$ bzw. in nMole ($^{86}Rb^+ + K^+$)/mg Protein x min. für $^{86}Rb^+$ bestimmt werden:

$^{42}K^+$: Aufnahme: 10,2 nMole ($^{42}K^+ + K^+$)/mg Protein x min.

$^{86}Rb^+$: Aufnahme: 13,6 nMole ($^{86}Rb^+ + K^+$)/mg Protein x min.

In einem anderen Experiment wird die Aufnahme des Tracers $^{86}Rb^+$ (0,5 μ M) in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen bei unterschiedlicher K^+ - bzw. Rb^+ -Konzentration der Inkubationslösung gemessen (Meßzeit 10 min., Temp. = 37°C). Es ergeben sich folgende Aufnahmezeiten, ausgedrückt in nMole ($^{86}Rb^+ + K^+$)/mg Protein x min. bzw. in nMole ($^{86}Rb^+ + Rb^+$)/mg Protein x min.:
(K^+) = 0,1 mM, 1,01 $\pm$ 0,01; (Rb^+) = 0,1 mM, 1,14 $\pm$ 0,05;
(K^+) = 5 mM, 10,11 $\pm$ 0,36; (Rb^+) = 5 mM, 10,49 $\pm$ 1,16.

Die durchgeführten Experimente zeigen Ergebnisse, die in Einklang stehen mit aus der Literatur bekannten Daten (siehe oben). Deshalb wurde der K^+ -Strom über die Zellmembran weitgehend mit dem K^+ -Analogon $^{86}Rb^+$ durchgeführt und als aufgenommene Menge ($^{86}Rb^+ + K^+$) angegeben.

2.6 BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN K^+ - UND Na^+ -GEHALTE

Für die Bestimmung des zellulären K^+ -Gehaltes fanden zwei voneinander unabhängige Methoden Anwendung:

a) Flammenphotometrische Bestimmung der K^+ -Ionen:

In diesen Experimenten wurden die Messungen der Aufnahme von $^{86}Rb^+$, $^{22}Na^+$ bzw. $^{42}K^+$ - wie oben bereits dargestellt - durchgeführt mit nachfolgendem Spülen der Kulturen in einer Ca-Sorbitol-Waschlösung anstelle der normalen Waschlösung (vgl. 2.7). Nach Auflösung der Zellrasen mit Zell-Detergenz (1 ml/25 cm² Fläschchen), wurden 500 μ l für die Radioaktivitätsmessung abpipettiert und je 2 100 μ l-Portionen zur flammenphotometrischen Bestimmung des K^+ -Gehaltes verwendet (Eppendorff Flammenphotometer).

- b) Messung des zellulären Gehalts an austauschbarem K^+ mittels $^{86}Rb^+$ bzw. $^{42}K^+$ unter Äquilibrierungsbedingungen: Kultivierte Herzzellen wurden in HeS (5,4 mM KCl) mit dem Tracer $^{86}Rb^+$ bzw. $^{42}K^+$ inkubiert und die gebundene Radioaktivität nach Einstellung des Äquilibriums (Abb. 25) gemessen. Aus der flammenphotometrischen Bestimmung und der Messung des ($^{42}K^+$)-Äquilibriums erhielt man vergleichbare Ergebnisse, während K^+ -Spiegel, die über ($^{86}Rb^+$)-Gleichgewichtsmessungen bestimmt wurden, ungefähr um 30 % höher lagen (Tab. 6 und Abb. 25).

Der intrazelluläre Gehalt an austauschbarem Na^+ wurde in ähnlicher Weise durch Messung des zellulär gebundenen Tracers $^{22}Na^+$ unter Äquilibrium-Bedingungen bestimmt. In allen untersuchten kultivierten Herzzellen ist das Gleichgewicht innerhalb von 3 Stunden erreicht, was die Aufnahme von $^{42}K^+$, $^{86}Rb^+$ und $^{22}Na^+$ betrifft (vgl. Tab. 6 und Abb. 25). Wie bei den Aufnahme Prozessen, so erfolgte auch hier eine Korrektur der Meßwerte um den "Nullwert" bzw. den Extrazellulärraum (siehe 2.5).

Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten stellen Mittelwerte eng korrelierender Doppel- oder Dreifachwerte dar. Alle beschriebenen Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

2.7 INKUBATIONSMEDIEN UND LÖSUNGSVERHALTEN VON INSULIN UND Na_3VO_4

- a) Wachstums (Züchtungs)-Medium:
CMRL 1415 (Fa. Seromed, D 8000 München) gemäß (82) ergänzt mit 10 % fetalem Kälber-Serum (Seromed), 10 % Pferde-Serum (Seromed) und 0,05 mg/ml Gentamycin
- b) PBSAG = Phosphate-Buffered Saline A + Glukose:
PBSA stellt eine von Harary et al. (81) beschriebene Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freie Salzlösung dar mit folgender Zusammensetzung: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ 10,6 mM, KH_2PO_4 2,1 mM. Da noch D-Glukose (Endkonzentration = 5 mM) zugegeben wurde, soll die Bezeichnung PBSAG verwendet werden.

c) HeS = Hepes-gepufferte Salzlösung:

NaCl 135 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,05 mM,
NaH₂PO₄ 0,36 mM, D-Glukose 10 mM, Hepes 20 mM; Einstellung
des pH-Wertes mit NaOH auf 7,25.

d) Wasch (Spül)-Lösung:

wie unter c) beschrieben, jedoch nur mit 3 mM Hepes

e) Ca-Sorbitol-Lösung:

CaCl₂ 1,8 mM, Sorbit 280 mM; Einstellung des pH-Wertes
mit NaOH auf 7,25

f) Lösungsverhalten von Insulin:

In allen Experimenten, die die Wirkung von Na₃VO₄ und In-
sulin auf (⁸⁶Rb⁺+K⁺)-Einstrom, zellulären K⁺-Gehalt und
2-deoxy-D-(³H)-Glukose-Aufnahme beschreiben, wurden 5 µg
Rinder-Albumin/ml HeS zugegeben, um eine unspezifische
Eiweißwirkung von Insulin auszuschließen.

Insulin wurde folgendermaßen in Lösung gebracht:

Rinder-Insulin (23,6 U/mg) wurde erst in 0,01 N HCl (etwa
100 µl 0,01 N HCl auf 1 mg Insulin) gelöst, dann HeS mit
5 µg Rinder-Albumin/ml entsprechend der gewünschten Ver-
dünnung zugegeben und mit NaOH der pH-Wert wieder auf 7,25
eingestellt.

g) Lösungsverhalten von Na₃VO₄:

Na₃VO₄ wurde in der jeweiligen Inkubationslösung (meist HeS)
gelöst (Endkonzentration 10⁻²M bzw. 10⁻³M) und ggf. weiter
verdünnt. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,25 erfolgte
mit HCl bzw. mit Hepes; dabei wurden die experimentellen
Ergebnisse durch die Wahl des Neutralisationsmittels nicht
beeinflusst (Experimente nicht gezeigt). Die übrigen aufge-
führten Vanadiumverbindungen wurden in 10⁻³M Konzentration
in Lösung gebracht und der pH-Wert mit NaOH bzw. HCl auf
7,25 eingestellt. Die Verwendung der einzelnen Lösungen er-
folgte frühestens 24 Stunden nach ihrer Herstellung. Bezüg-
lich detaillierter Informationen über die Vanadium-Chemie
siehe S. 81.

2.8 PRÄPARATION UND MESSUNG DER ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-AKTIVITÄT NEONATALER RATTEN-HERZEN

Herzen 200 neonataler (1 - 3 Tage alter) Wistar-Ratten werden nach Dekapitierung der Tiere schnell ihrem Situs entnommen. Dann führt man die Präparation der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-enthaltenen Zellmembranen durch wie in (47) beschrieben. Die Messung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität erfolgt mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests (146); dabei wird die Reaktion kontinuierlich beobachtet. Eine Enzym-Einheit (U) ist definiert als der Betrag an Enzym, der 1 μMol ATP pro min. bei 37°C hydrolysiert. Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Lowry et al. (111) durchgeführt.

2.9 MATERIALIEN

Die verwendeten (Radio)-Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Buchler, D 3300 Braunschweig: Inulin-(^{14}C)-Carboxylsäure, 2,02 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; (^{42}K)- KCl , 22 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$; 2-deoxy-D-(1- ^3H)-Glukose, 15 Ci/mMol ; $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ 0,6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.

BDH Chemicals, GB-Poole, England: Na_3VO_4 .

Boehringer Mannheim, D 6800 Mannheim: Tetrodotoxin, Nr. 161560; g-Strophanthin, Nr. 109363; FCCP, Nr. 103209.

Byk-Essex, D 8000 München: Gentamycin (Sulmycin (R)).

NEN Chemicals, D 6072 Dreieich: (^{22}Na)- NaCl , Trägerfrei; (^{86}Rb)- RbCl , 3,9 mCi/mg .

Riedel-de Haen, D 3016 Seelze-Hannover: V_2O_5 ; VCl_3 ; NaVO_3 ; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{V}$.

Seromed, D 8000 München: Collagenase "Worthington", 168 U/mg , CLS II; Fetales Kälber-Serum, Nr. 0113; Pferde-Serum, Nr. 0133; CMRL 1415 ATM-Medium.

Serva Biochemica, D 6900 Heidelberg: Rinder-Albumin, Nr. 11920; Trypsin 1 : 250, Nr. 37920; Hepes, Nr. 25245; Sorbit, Nr. 35230; Jodessigsäure, Nr. 26792.

Sigma Chemie, D 8028 Taufkirchen: 2-deoxy-D-Glukose, Grad III, Nr. D 6134; Rinder-Insulin, 24 I.U./mg, Nr. 15500.

D 600-HCl wurde uns freundlicherweise überlassen von der Fa. Knoll AG, D 6700 Ludwigshafen. Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden von der Fa. Merck, D 6100 Darmstadt, der Fa. Boehringer Mannheim, D 6800 Mannheim, und der Fa. Serva Biochemica, D 6900 Heidelberg, bezogen.

2.10 ABKÜRZUNGEN

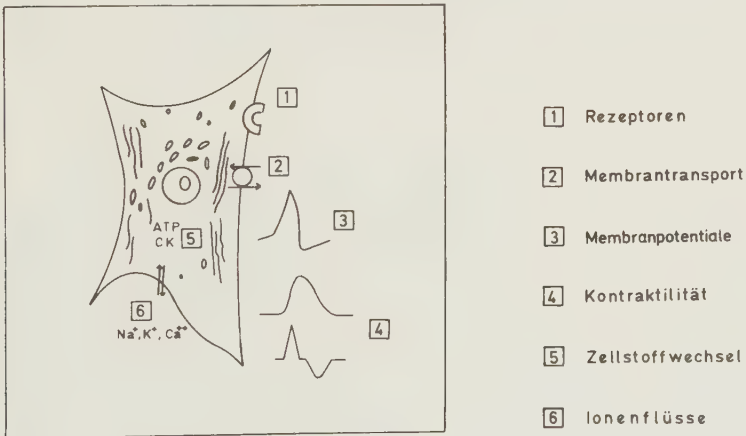
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
c-AMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CMRL	CMRL 1415 ATM-Medium (siehe 2.7)
D 600	Gallopamil-Hydrochlorid
DAT	Differential attachment technique (siehe 2.1)
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Äthylenglycol-bis (2-aminoäthyläther)-N,N-tetraessigsäure
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
Hepes	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure
HeS	Hepes-gepufferte Salzlösung (siehe 2.7)
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Inhibierung
K _M	Michaeliskonstante
MEM	Minimal essential medium
NADH	Nicotinadenindinucleotid
NADPH	Nicotinadeninnucleotidphosphat
PBSAG	Phosphate-buffered saline A + Glukose (siehe 2.7)
SC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Stimulierung
TTX	Tetrodotoxin
V	Transportgeschwindigkeit, Aufnahme rate
⁴⁸ V	radioaktiv markiertes Vanadium
V ^{III, IV, V}	+3-, +4- und +5-wertiges Vanadium

3. ANALYSIERUNG DER PHARMAKON- BZW. HORMON-WIRKUNG AUF MYOKARD-GEWEBE MIT HILFE KULTIVierter HERZMUSKELZELLEN

In den letzten Jahren haben kultivierte Herzmuskelzellen bei der Analysierung von Pharmakon- bzw. Hormon-Wirkungen auf Myokard-Gewebe zunehmend an Bedeutung gewonnen. Als kleinste funktionstfähige Einheit myokardialen Gewebes (vgl. schematische Darstellung der Abb. 8) besitzt die kultivierte Herzmuskelzelle weitgehend die Eigenschaften des entsprechenden intakten Herzmuskelgewebes (Überblick bei (126, 163)). Im direkten Vergleich mit alternativen Methoden erweist sich die Herzmuskel-

Abb. 8

Möglichkeiten der Analyse von Hormon- bzw. Pharmakon-Wirkungen in kultivierten, kontrahierenden Herzmuskelzellen
(schematische Darstellung)



Weitere Einzelheiten siehe Text.

Zellkultur jedoch in vieler Hinsicht als Überlegen. Die folgenden Abschnitte sollen diesen Sachverhalt kritisch beleuchten und über eine Schilderung der Einsatzmöglichkeiten bei verschiedensten pharmakologisch-experimentellen Fragestellungen (vgl. Abb. 8) eine kurze Charakterisierung dieser kultivierten Herzmuskelzellen entwickeln.

3.1 REZEPTOREN

Myokardiale Rezeptoren herzwirksamer Pharmaka bzw. Hormone werden mit Hilfe radioaktiv markierter Verbindungen gut charakterisiert und quantifiziert. So wurden bei Studien mit kultivierten (bzw. isolierten) Herzmuskelzellen spezifische Bindungsstellen beschrieben für Herzglykoside (60, 117), β -Sympathomimetika (107, 109) und Insulin (34, 53). Aus weiteren Untersuchungen muß die Existenz zusätzlicher Rezeptoren der Herzmuskelzelle gefordert werden, z. B. für Histamin (28, 91), Trijodthyronin (168), Glukagon (16) oder Prostaglandine (173).

Häufig werden Rezeptorstudien mit Zellmembranfragmenten durchgeführt. Hierfür stellt die Bindung von Herzglykosiden an die isolierte $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase der Zellmembran ein bekanntes Beispiel dar (43, 44). Von diesen in vitro-Experimenten am isolierten Enzym darf keinesfalls vorschnell auf eine analoge Situation in der intakten Herzmuskelzelle geschlossen werden. Diese Problematik erfährt gerade durch die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen mit Vanadat (vgl. Abb. 19 und 20) eine ganz besondere Aktualität.

Isolierte Herzmuskelpräparate oder perfundierte Herzen in Form des Langendorff-Präparats zeigen gegenüber Herzmuskelzellen in Kultur wesentlich längere Diffusionswege und damit den Nachteil einer langsameren Einstellung der Äquilibrierungsbedingungen für den getesteten Liganden.

Als grundsätzliches Problem muß der Homogenitätsgrad des zu untersuchenden Zellmaterials angesehen werden: In Herzmuskelgewebe, das nicht enzymatisch disaggregiert worden war, findet sich bei adulten Tieren eine Myokard-Zelle auf drei Nicht-Muskelzellen (29), während bei den Herzen neonataler Ratten - mit einem Fibroblasten-Anteil von ca. 22 % (vgl. Legende der Abb. 3) - durch die "DAT"-Methodik (14) der Prozentsatz an Herzmuskelzellen sogar noch zusätzlich gesteigert werden konnte auf über 80 % der Gesamtzellzahl (vgl. 2.1).

3.2 MEMBRANTRANSPORT UND IONENFLÜSSE

Die Untersuchung von Transportprozessen und Ionenflüssen im Myokardgewebe wird kompliziert durch das Vorhandensein von 3 Kompartimenten - Intravasal-, Intrazellulär- und Interzellulär-Raum -, wobei letzterer im Herzmuskelgewebe mit ca. 40 % (Erdmann und Philipp, unveröffentlicht; vgl. (11)) einen relativ großen Anteil einnimmt. Beim Arbeiten mit kultivierten Herzmuskelzellen in Monolayer-Form liegen dagegen nur noch 2 Kompartimente vor; hier ist der Interzellularraum mit ca. 5 % des Intrazellulär-raumes (siehe 2.4) beinahe vernachlässigbar klein.

Transportstudien wurden durchgeführt z. B. für Aminosäuren (37, 57), Glukose (33, 58), Fettsäuren (127) bzw. Carnitin (120). Durch den Transport von radioaktiven K^+ -Ionen ins Zellinnere bzw. den Hinaustransport von $^{22}Na^+$ konnte die Pumpaktivität der membranständigen (Na^++K^+) -ATPase, die den zellulären Rezeptor für Herzglykoside darstellt, charakterisiert werden (117).

3.3 MEMBRANPOTENTIALE

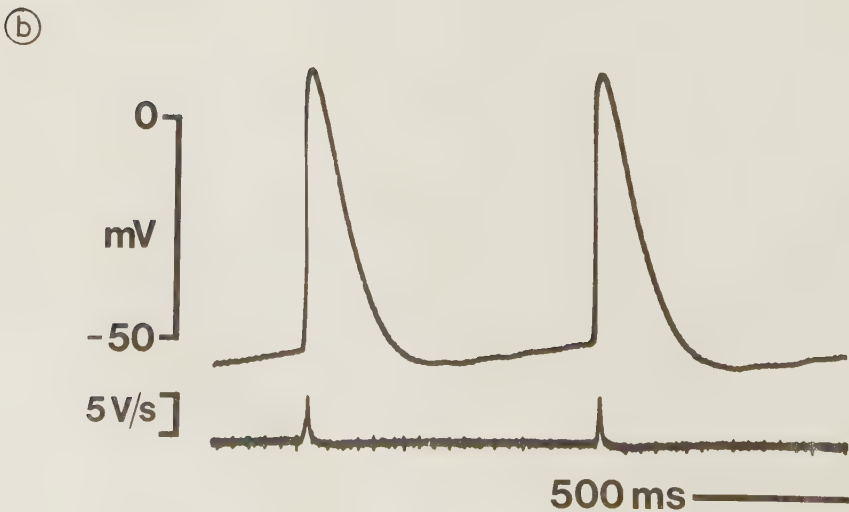
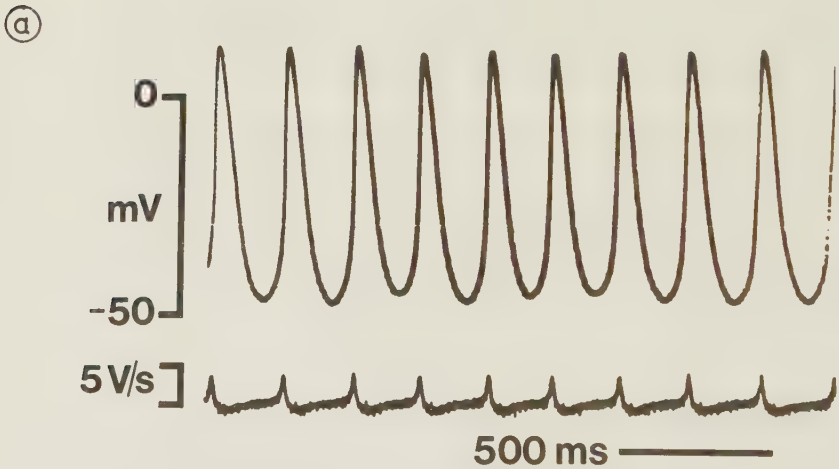
Elektrophysiologische Untersuchungen stellen eine hilfreiche Ergänzung dar zur Analysierung des Kontraktionsverhaltens und dessen Modifizierung durch kardioaktive Pharmaka (5, 96, 102, 169) sowie zur Registrierung intra-extrazellulärer Elektrolytverschiebungen (118, 167). Durch Ableitung von Membranpotentialen können in einer homogenen Herzmuskelzell-Population unterschiedliche myokardiale Zelltypen differenziert werden:

Die Abbildungen 9 a, b und c zeigen Membranpotential-Registrierungen, wie sie typisch sind für "aktuelle" bzw. "potentielle" Schrittmacherzellen bzw. "getriebene" Myokardzellen; nähere Einzelheiten finden sich in den Legenden der jeweiligen Abbildungen. Der Anteil an Schrittmacherzellen in einer Zellpopulation stellt sich als abhängig vom Alter der für die Präparation verwendeten Tiere dar: In den von uns verwendeten Zellkulturen aus den Herzen 1 - 3 Tage alter Ratten besitzen

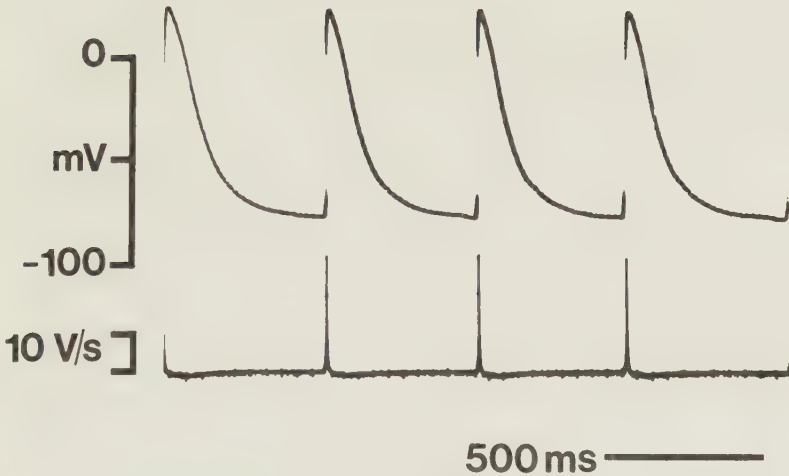
ca. 80 % aller Zellen Schrittmachereigenschaften; dieser Anteil sinkt jedoch bei Verwendung 6 - 7 Tage alter Tiere auf 10 - 20 % ab (vgl. 4.2.3 und Abb. 16).

Abb. 9

Kennzeichnung verschiedener Typen kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen durch Membranpotentiale



(C)



- a): "aktuelle" Schrittmacher-Zelle
- b): "potentielle" Schrittmacher-Zelle
- c): "getriebene" Myokard-Zelle

ad a): Ruhepotential -47 mV, Overshoot +11 mV, Aufstrichgeschwindigkeit 5 V/sec., Kontraktionsfrequenz um 260/min.. Schrittmacherzellen zeichnen sich durch eine spontane diastolische Depolarisation aus, die nach Erreichen eines Schwellenpotentials zu einem erneuten Aktionspotential führt.

ad b): Ruhepotential -55 mV, Overshoot +12 mV, Aufstrichgeschwindigkeit 6,5 V/sec., Geschwindigkeit der diastolischen Depolarisation 10 mV/sec., Kontraktionsfrequenz um 60/min.. Bei "potentiellen" Schrittmacherzellen wird das Aktionspotential nicht durch die eigene (zu langsame) diastolische Depolarisation ausgelöst, sondern durch synzytiale Übernahme der Erregung einer schnelleren Schrittmacher-Zelle aus dem gleichen Gewebeverband.

ad c): Ruhepotential -77 mV, Overshoot +23 mV, Aufstrichgeschwindigkeit 32 V/sec., Kontraktionsfrequenz um 120/min.. Negativeres Ruhepotential und größere Aufstrichgeschwindigkeit als beim Schrittmachertyp kennzeichnen die "getriebene" Myokard-Zelle. Da die Befähigung zu einer spontanen diastolischen Depolarisation fehlt, ist die Auslösung eines Aktionspotentials - und damit einer Kontraktion - nur möglich durch synzytiale Übernahme der Erregung einer Schrittmacher-Zelle aus dem gleichen Gewebeverband.

Die elektrophysiologischen Kenngrößen der oben gezeigten Membranpotentiale stimmen weitgehend mit den Werten anderer Autoren für kultivierte Herzmuskelzellen in Monolayer- bzw. Cluster-Form oder intaktes Myokardgewebe überein (Überblick bei (4, 163)). Lediglich über die Anstiegssteilheit des Aktionspotentials, die als elektrophysiologisches Korrelat des "schnellen" Na^+ -Kanals (62) und damit als Parameter für Empfindlichkeit gegenüber TTX gilt (12), liegen sehr unterschiedliche und zum Teil auch widersprüchliche Angaben vor (Überblick bei (4)). In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Bernard (12) interessant, die 2 Zelltypen hinsichtlich Kontraktilität, Elektrophysiologie und TTX-Ansprechbarkeit unterscheiden; wahrscheinlich handelt es sich hier um Schrittmacher- und "getriebene" Myokard-Zelle. Ionenfluß-Studien zeigen, daß in kultivierten Herzmuskelzellen, die als TTX-unempfindlich erscheinen, erst latent vorhandene "schnelle" Na^+ -Kanäle durch Cevaterum-Alkaloide demaskiert werden müssen, um dann - wie an intaktem Myokard-Gewebe - durch TTX eine Antagonisierung des Na^+ -Einstroms herbeiführen zu können (12, 55, 62).

3.4 KONTRAKTILITÄT

Charakterisierung und Quantifizierung des Kontraktionsablaufs kultivierter Herzmuskelzellen erfolgen durch ein spezielles photoelektrisches System (siehe 2.2).

Dieser Meßvorrichtung sind in ihrer Aussagekraft jedoch Grenzen gesetzt im Vergleich zu Kontraktionskurven, wie man sie bei der Arbeit mit makroskopischen Muskelpräparaten über definierte Registrierungsmethoden erhält:

So stellt sich bei kultivierten Herzmuskelzellen die Zuordnung des Kontraktionsablaufes zu einem ausschließlich isometrischen (101) bzw. isotonischen (96) Kontraktionstyp als problematisch dar, wenngleich man aufgrund der pulsationsbedingten Verkürzung des Zelldurchmessers zumindest eine isotonische Komponente der Kontraktion postulieren muß. Durch die Abwesenheit ausschließlich isometrischer Verhältnisse sowie weitere muskelpathologische Eigenheiten der Herzmuskelzelle in Kultur

(siehe (96)) sind inotrope Effekte nur schlecht registrier- bzw. quantifizierbar.

Trotz dieser methodischen Schwierigkeiten konnte an Herzmuskel-Zellkulturen eine Zunahme der Kontraktionskraft - als Zunahme entweder der Pulsationsamplitude oder deren 1. Ableitung - nachgewiesen werden für Herzglykoside (102), Ca^{2+} -Ionen (6) und eine ganze Reihe weiterer Verbindungen (16). Derartige Versuchsergebnisse sollten jedoch nur in Zusammenhang mit vergleichbaren Resultaten, erhoben am intakten Herzmuskel-Präparat, beurteilt werden.

Chronotrope bzw. bathomotrope Effekte an kultivierten Herzmuskelzellen werden beschrieben bei Modifizierung der Kultivierungsbedingungen (pH-Wert (78), Temperatur (16, 101), extrazelluläre K^{+} -, Na^{+} - bzw. Ca^{2+} -Konzentration (66, 67, 101), Zusatz von Serumlipiden bzw. Fettsäuren (80)) oder in Anwesenheit herzwirksamer Pharmaka (Herzglykoside (101, 102), Antiarrhythmika (67, 116), verschiedener Hormone (16) oder β -Sympathomimetika (96, 97)).

Gerade für Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens sind Herzmuskelzellen in kultivierter Form wegen der kurzen Anflutzeit der getesteten Substanz und der Ausschaltung störender Überlagerungen durch neurohumorale oder vasoaktive Einflüsse besonders geeignet.

3.5 ZELLSTOFFWECHSEL

Zwischen Kontraktilität und Zellstoffwechsel der Herzmuskelzelle besteht ein enger Zusammenhang. So gibt die Tab. 1 einen Einblick in den Energiehaushalt kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen unter gleichzeitiger Beobachtung der Kontraktionstätigkeit: Der Gehalt an energiereichen Phosphaten beträgt für ATP ca. 20 nMole/mg Zellprotein (vgl. (93, 152)), für Kreatinphosphat ca. 10 nMole/mg Zellprotein. Der ATP/ADP-Quotient liegt bei etwa 10 (vgl. (70)). Für adultes Myokardgewebe (Langendorff-Präparat) werden folgende Werte - bezogen auf g Trockengewicht - angegeben (134): ATP 25 μMole , Kreatinphosphat 39 μMole , ADP 4 μMole , Intrazellulär-Wasser 2,0 ml, Gewebe-Wasser 3,76 ml.

Tab. 1

Energiereiche Phosphate in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen

	nMole / mg Protein						Kontraktionen
	ATP	ADP	Kreatinphosphat (Krp)	Kreatin (Kr)	ATP / ADP	KrP / Kr	
Kontrolle	22,6	2,3	10,5	4,6	9,8	2,3	+
Jodessigsäure (0,5 mM)	20,6	2,2	5,8	10,2	9,4	0,6	+
FCCP (0,5 µM)	9,0	4,1	1,5	12,6	2,2	0,1	●
JE (0,5 mM) + FCCP (0,5 µM)	1,5	2,1	0,6	11,6	0,7	0,05	●

FCCP = Carbonylcyanid - p - trifluoromethoxyphenylhydrazon ; JE = Jodessigsäure

Inkubation der Zellen für 10 min. in HeS bzw. 0,5 mM JE und/oder 0,5 µM FCCP; Temp. = 37°C. Die Aufarbeitung des Zellhomogenats und die Bestimmung der zellulären Gehalte an ATP, ADP, Kreatinphosphat und Kreatin erfolgten mit der Gefrierstopmethode. Weitere Einzelheiten siehe unter (160).

Blockiert man nun in den kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen mit Jodessigsäure das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase der Glykolyse und damit eine Möglichkeit der ATP-Synthese, so sinkt der ATP-Gehalt nur unwesentlich, das als Energiespeicher fungierende Kreatinphosphat jedoch auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes (Tab. 1). Wird dagegen durch FCCP eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien vorgenommen, fällt der ATP-Gehalt drastisch auf weniger als 50 % der Kontrolle ab, der Wert für Kreatinphosphat beträgt nur mehr 1/7 im Vergleich zur Situation vor Versuchsbeginn (Tab. 1). Durch die massivere Blockierung des Aufbaus energiereicher Phosphate beobachtet man hier erstmals - innerhalb von wenigen Minuten - ein Sistieren der Kontraktionstätigkeit. Wurden beide Möglichkeiten zur ATP-Synthese gleichzeitig unterbrochen, lassen die resultierenden Meßwerte

der untersuchten Parameter auf noch dramatischere Veränderungen des zellulären Energiehaushaltes schließen; so wird auch nach weniger als 60 Sekunden keine Kontraktionstätigkeit mehr registriert (Tab. 1).

Studien über den Aminosäure-, Glukose- und Fettsäure-Metabolismus zeigen für kultivierte Herzmuskelzellen ähnliche Resultate wie für intaktes Herzmuskelgewebe (58, 129, 138). Im Gegensatz zum Myokard adulter Tiere, das seine chemische Energie vorwiegend aus dem Abbau von Fettsäuren bezieht, verwerten die Herzzellkulturen jedoch zu einem beträchtlichen Teil auch Glukose (58). Eine Umstellung ihres Stoffwechsels auf mehr aerobe Verhältnisse - charakteristisch für differenzierte Herzen - tritt während der Kultivierung nicht ein, was sich auch in der relativ geringen Zahl an Mitochondrien widerspiegelt (58). Aufgrund dieser Eigenschaften repräsentieren die kultivierten Herzmuskelzellen den Reifungsgrad ontogenetisch jungen (neonatalen bzw. embryonalen) Myokardgewebes (58).

Kurz zusammengefaßt, stellt die Arbeit mit kultivierten Herzmuskelzellen trotz der diskutierten Nachteile gegenüber etablierten Methoden ein alternatives Verfahren zur Analysierung von Pharmakon- bzw. Hormon-Effekten auf Myokardgewebe dar. Der Vorteil der Zellkultur zeigt sich vor allem darin, daß unter kontrollierten Bedingungen eine Vielzahl verschiedenster Fragestellungen gleichzeitig an ein und demselben Modell studiert werden kann.

4. ERGEBNISSE

4.1 AUFNAHME VON $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ IN KULTIVIERTE RATTEN-HERZMUSKELZELLEN

Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen werden in einer mit dem Tracer ^{48}V radioaktiv markierten Na_3VO_4 -Lösung unterschiedlich lange inkubiert (Abb. 10). Die erhaltene Aufnahmekinetik läßt primär jedoch keinerlei Unterscheidung zu zwischen Bindung von Vanadat an die Zellmembran oder Aufnahme ins Zellinnere. Da es sich bei diesem Vorgang aufgrund indirekter Schlüsse (siehe unten) am ehesten um eine Aufnahme von Na_3VO_4 ins Zellinnere handelt, soll im weiteren Text von "Aufnahme" gesprochen werden.

4.1.1 Charakterisierung der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme

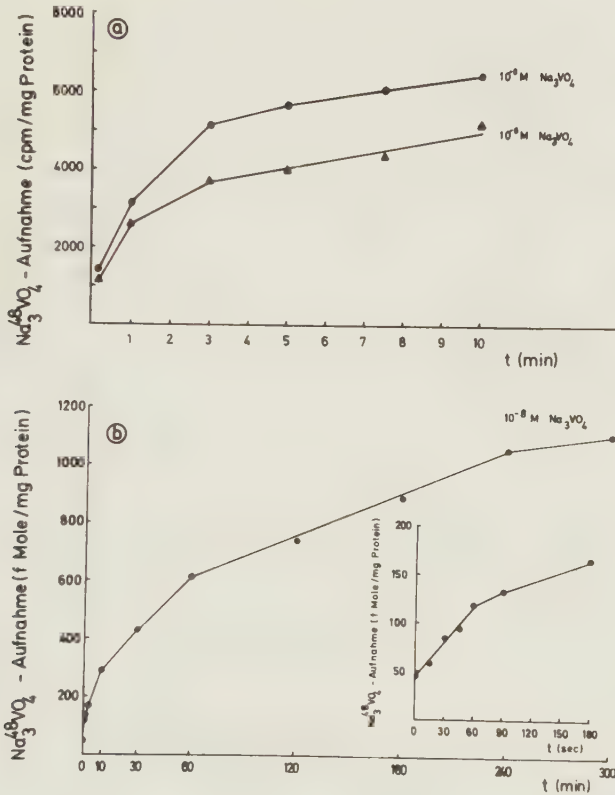
Zunächst werden Zeitabhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Vanadataufnahme rein deskriptiv dargestellt. Daraufhin folgen weitere Experimente, die diesen Vorgang auf seine Abhängigkeit von verschiedenen experimentellen Parametern - Komplexierung mit Noradrenalin, Energieabhängigkeit, Temperaturabhängigkeit und Kompetition - untersuchen und dadurch näher charakterisieren sollen.

Zeitabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme

Abb. 10 a zeigt die Aufnahme von radioaktiv markiertem $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierte, kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Bei beiden Konzentrationen (10^{-8}M und 10^{-6}M) stellt sich ein Kurvenverlauf dar, der deutlich zwei unterschiedliche Komponenten erkennen läßt: Initial (1 - 3 min.) imponiert eine rasche Kinetik, während in den folgenden Minuten die Geschwindigkeit der Vanadataufnahme sehr viel langsamer wird. Dieser Prozeß wird durch die Abb. 10 b in seinen Bestandteilen genauer charakterisiert: Im Sekundenbereich, dargestellt im Inset der Abb. 10 b, bleibt nach Zugabe von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ die Vanadataufnahme lediglich über einen Zeitraum von 60 sec. linear. In den folgenden Minuten nimmt

Abb. 10

Kinetiken der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen



- a): Temp. = 37°C ; $0,44 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche; 0,23 mg Protein/Flasche
- b): Temp. = 37°C ; $0,08 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche; 0,66 mg Protein/Flasche; $1,03 \times 10^6$ Zellen/Flasche (zur Bestimmung der Zellzahl/Flasche siehe Legende zu Tab. 3)

Inset der Abb. 10 b): Bei Zugrundelegung eines Zell-Volumens von $2,6 \mu\text{l}/10^6$ Zellen (117) kann die intrazelluläre $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Konzentration berechnet werden (jeweilige Inkubationsdauer in Klammern angegeben): $0,5 \times 10^{-8}\text{M}$ (15 sec.); $1,2 \times 10^{-8}\text{M}$ (30 sec.); $1,4 \times 10^{-8}\text{M}$ (45 sec.); $2,6 \times 10^{-8}\text{M}$ (60 sec.); $3,4 \times 10^{-8}\text{M}$ (90 sec.); $4,1 \times 10^{-8}\text{M}$ (180 sec.). Nach weiteren experimentellen Details siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

die Geschwindigkeit des Aufnahmeprozesses mit steigender Inkubationszeit ab. Nach ca. 300 min. befindet sich die Aufnahme von radioaktiv markiertem Vanadat (10^{-8}M) weitgehend im Gleichgewicht.

Konzentrationsabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme

Inkubiert man kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen bei unterschiedlichen Na_3VO_4 -Konzentrationen und mißt dabei die initiale Komponente der Vanadataufnahme (bis 60 sec.), so stellt sich in der Auftragung V (Aufnahmerate) gegen S (Na_3VO_4 -Konzentration) ein Kurvenverlauf dar, der mit einem sättigbaren Aufnahmevergange vereinbar ist (Abb. 11 a). In der Auftragung nach Hanes (S/V gegen S; Abb. 11 b) ergeben die Daten dieses Experiments eine Michaeliskonstante K_m von $45\text{ }\mu\text{M}$ und eine maximale Transportgeschwindigkeit V_{Max} von $68\text{ pMole/mg Protein} \times \text{min.}$ bei 37°C . Bei Berücksichtigung weiterer Versuche erhält man für K_m und V_{Max} Mittelwerte von $72\text{ }\mu\text{M}$ und $197\text{ pMole/mg Protein} \times \text{min.}$ bei 37°C ($n=4$).

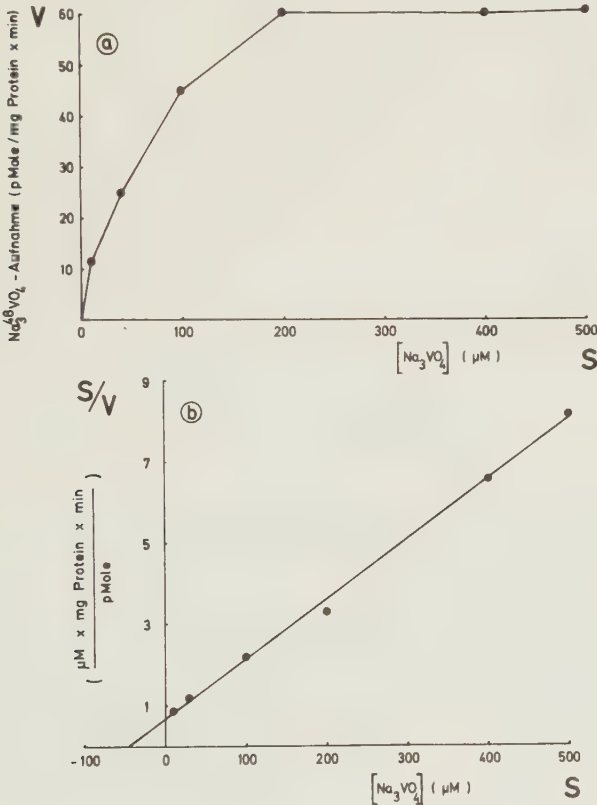
Für fibroblastoide Rattenherzzellen liegen die $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Transportraten im gleichen Meßbereich wie für kontrahierende Herzmuskelzellen derselben Tierspezies: Rattenherz-Nichtmuskelzellen $67 \pm 9\text{ fMole/mg Protein} \times \text{min.}$, Rattenherz-Muskelzellen $89 \pm 22\text{ fMole/mg Protein} \times \text{min.}$ (Na_3VO_4 -Konzentration = 10^{-8}M ; $m \pm \text{S. D.}$, $n=4$; Temp. = 37°C).

Aufnahme von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in Gegenwart von Noradrenalin

Wäscht man nun die schlagenden Herzmuskelzellen nach 60 sec. langer Inkubation in 10^{-8}M $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ mit $2,5\text{ mM}$ Noradrenalin, das eine Komplexbindung mit Vanadat eingeht (20, 87, 88, 105), so kann das zellulär gebundene $^{48}\text{VO}_4^{3-}$ nicht ausgewaschen werden: Kontrolle $147 \pm 10\text{ fMole/mg Protein} \times \text{min.}$, Waschen mit $2,5\text{ mM}$ Noradrenalin $141 \pm 3\text{ fMole/mg Protein} \times \text{min.}$ (Na_3VO_4 -Konzentration = 10^{-8}M ; $m \pm \text{S. D.}$, $n=3$). Dieses Ergebnis diente bei menschlichen Erythrozyten als Beleg dafür, daß Na_3VO_4 ins Zellinnere aufgenommen wird. Vanadat scheint also nicht an die Außenseite der Zellmembran gebunden zu werden. Von dort aus würde es durch Noradrenalin komplexiert werden und ab-

Abb. 11

Konzentrationsabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen



Abszisse: $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Konzentration (S) der Inkubationslösung
Ordinate: (a) $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahmegeschwindigkeit (V)

(b) S/V

Die Messungen wurden im linearen Bereich der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahmekinetik zwischen jeweils 10 und 60 sec. durchgeführt. Temp. = 37°C ; $1,18 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche eingesetzt; Zellprotein-Gehalt: 1,76 mg Protein/Flasche.

In Abb. 11 b wurden die Daten aus Abb. 11 a als Hanes Plot aufgetragen, so daß sich ein K_m -Wert von 45 μM und eine maximale Geschwindigkeit V_{Max} von 68 pMole/mg Protein x min. für die Vanadat-Aufnahme ergibt ($r = 0,99$). Nach weiteren experimentellen Details siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

dissoziieren (20). Man kann also annehmen, daß es sich bei der postulierten initialen $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme nicht um eine leicht reversible Bindung an die Zellmembran-Außenseite handelt. Die Ergebnisse sprechen eher für einen Vanadat transportierenden Aufnahme-prozeß in das Zellinnere.

Energieabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme

Die beschriebene initiale, lineare Vanadataufnahme in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen ist energieunabhängig: Inkubiert man die Zellen in 0,5 μM Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP), einem Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, und gleichzeitig in 0,5 mM Jodessigsäure, einem Glykolysehemmer, so findet man nach 10 min. einen Abfall des intrazellulären ATP von 22,6 auf 1,5 nMole/mg Protein und eine drastische Verminderung des ATP/ADP-Quotienten von 9,8 auf 0,7 (Tab. 1). Demzufolge beobachtet man bereits nach 20 - 60 sec. ein abruptes Sistieren der Herzmuskelzell-Kontraktionen. Die Aufnahme von Na_3VO_4 wird jedoch durch den beschriebenen Energiemangel nicht gesenkt: Kontrolle 158 ± 10 fMole/mg Protein x min., FCCP + Jodessigsäure 172 ± 20 fMole/mg Protein x min. (Na_3VO_4 -Konzentration = 10^{-8}M ; $m \pm \text{S.D.}$, $n=3$).

Temperaturabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme

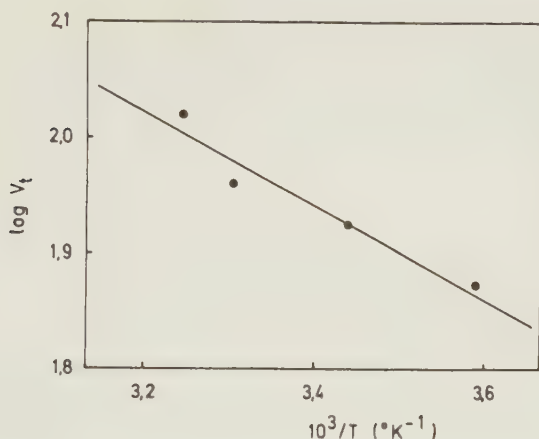
Wie Abb. 12 demonstriert, besteht für die $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Transportrate nur eine geringe Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur: Senkt man letztere von 35°C stufenweise auf 30°C , 18°C und schließlich 5°C ab, so zeigt sich lediglich eine geringgradige Verlangsamung der initialen Vanadat-Aufnahme. Bei Auftragung dieser Daten nach Arrhenius (Abb. 12) ergeben sich ein Temperaturkoeffizient Q_{10} von 1,1 und eine freie Reaktionsenthalpie ΔE_{act} von 0,8 kcal/Mol. In zwei weiteren Experimenten wurde jeweils eine Q_{10} von 1,1 und eine ΔE_{act} von 0,9 kcal/Mol bestimmt.

Kompetition der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme

Die kompetitive Wirkung verschiedener Vanadiumverbindungen auf die Aufnahme von radioaktiv markiertem Orthovanadat (Na_3VO_4)

Abb. 12

Temperaturabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen (Arrhenius Plot)



Die Messungen wurden im Bereich der linearen $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahmephase zwischen jeweils 10 und 60 sec. durchgeführt. 30minütige Vorinkubation der Zellen in HeS bei den Temperaturen 5,5, 17,5, 29,5 und 35°C (in der Inkubationslösung gemessen; Fehler $\leq 0,5^{\circ}\text{C}$). Dann Zugabe von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ (Endkonzentration = 10^{-8}M); dabei wurden $0,35 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 0,64 mg Protein/Flasche.

Die Auftragung der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahmeraten V_t in logarithmierter Form gegen die Reaktionstemperatur (Arrhenius Plot) ergibt eine lineare Beziehung ($r = -0,97$), aus der eine Aktivierungsenergie $\Delta E_{\text{act}} \approx 0,8$ kcal ($3,3$ kJ)/Mol und eine $Q_{10} \approx 1,1$ bestimmt werden.

Nach weiteren experimentellen Details siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

wird in Tab. 2 dargestellt: Erhöht man die Na_3VO_4 -Konzentration um das 10.000fache von 10^{-8}M auf 10^{-4}M , so steigt die Vanadat-Aufnahme von 101 fMole/mg Protein x min. auf 307.200 fMole/mg Protein x min., während aufgrund der veränderten spezifischen Aktivität die gebundene Radioaktivität von 918 auf 128 cpm absinkt (Tab. 2). Zugabe von unmarkiertem Metavanadat (NaVO_3), Vanadium (IV) oxobis (2,4 - pentanedionat) ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{V}$), Vanadumpentoxid (V_2O_5) und Vanadium (III) - chlorid (VCl_3) in 10^{-4}M Konzentrationen vermindert ebenfalls

die Aufnahme von radioaktiv markiertem Orthovanadat (Na_3VO_4 -Konzentration = 10^{-8}M). Diese Daten zeigen, daß alle getesteten Vanadiumverbindungen um denselben Aufnahmemechanismus wie Na_3VO_4 konkurrieren und dabei eine ähnliche Affinität zeigen. Andere kardioktive Verbindungen, wie z. B. Phosphationen in Konzentrationen von 10^{-4}M bzw. 10^{-3}M , SO_4^{2-} (10^{-4}M) oder g-Strophanthin (10^{-3}M) (Experimente teilweise nicht gezeigt), vermögen dagegen die Aufnahme von radioaktiv markiertem 10^{-8}M Na_3VO_4 in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen nicht zu erniedrigen.

Tab. 2

$\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen. Konkurrenz mit verschiedenen Vanadium-Verbindungen

Die Messungen wurden im Bereich der linearen $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahmephase zwischen jeweils 10 und 60 sec. durchgeführt. Temp. = 37°C ; $0,46 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche eingesetzt; Zellprotein-Gehalt: 1,69 mg Protein/Flasche. $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ und die jeweilige Konkurrenz-Verbindung ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) wurden gleichzeitig zugegeben, nachdem die Zellen 60 min. in Hepes-gepufferter Salzlösung (hier ohne Phosphat) vorinkubiert waren.

Nach weiteren experimentellen Details siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Kompetitive Verbindung ($1 \times 10^{-4}\text{M}$)	$\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ - Konzentration (M)	$\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ - Aufnahme	
		cpm/Ansatz	fMole/mg Protein x min.
-	1×10^{-8}	918	101
-	1×10^{-4}	128	307.200
V_2O_5	1×10^{-8}	82	9
NaVO_3	1×10^{-8}	80	9
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{V}$	1×10^{-8}	141	25
VCl_3	1×10^{-8}	106	12
Na_2HPO_4	1×10^{-8}	968	105

4.1.2 Charakterisierung der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Anreicherung

Die Linearität der Vanadat-Aufnahme geht verloren, sobald die intrazelluläre Na_3VO_4 -Konzentration die der Inkubationslösung um den Faktor 2 bis 3 übersteigt (siehe Inset und Legende von Abb. 10 b). Der initial dominierenden, raschen Vanadat-Aufnahme

Tab. 3

Intrazelluläre Anreicherung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen

Kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen wurden 7 Stunden lang bei unterschiedlichen $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Konzentrationen (siehe unten) inkubiert, bis das Aufnahme-Äquilibrium erreicht war. Zusätzliche Inkubation der Zellen in $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ ($2,5 \times 10^{-8}\text{M}$, $1 \times 10^{-4}\text{M}$) für weitere 60 min. konnte die intrazelluläre Vanadium-Radioaktivität nicht erhöhen. $0,22 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche eingesetzt; Zellprotein-Gehalt: $0,49$ mg Protein/Flasche; $0,77 \times 10^6$ Zellen/Flasche (Bestimmung der Zellzahl/Flasche: Trypsinierung der Zellen/Flasche ($n = 3$), dann Waschen mit HeS, Zählen der Zellen mit Hilfe eines Häemocytometers und Bestimmung der Relation mg Protein/ 10^6 Zellen).

Anreicherungs-Faktor:

Totales intrazelluläres (^{48}V) (pMole/ 10^6 Zellen)

Zellvolumen ($2,6 \mu\text{l}/10^6$ Zellen) $\times$ $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Konzentration im Medium (μM)

Berechnung des freien intrazellulären (^{48}V) (pMole/ 10^6 Zellen): $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Konzentration im Medium (μM) $\times$ Volumen des Zellwassers ($1,93 \mu\text{l}/10^6$ Zellen). Die Werte für Zellvolumen und Zellwasser wurden den Daten von Mc Call (117) entnommen. Nach weiteren experimentellen Details siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

extrazelluläre $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ - Konzentration (M)	^{48}V -Anreicherungs- faktor intra-/extra- zellulär	intrazelluläres (^{48}V) (pMole/ 10^6 Zellen)		
		total	frei	gebunden
$2,5 \times 10^{-8}$	93	6,1	0,1	6,0
1×10^{-7}	54	14,0	0,2	13,8
1×10^{-6}	33	84,5	1,9	82,6
1×10^{-5}	11	272	19	253
1×10^{-4}	6,0	1.564	193	1.371
5×10^{-4}	3,1	4.050	965	3.085
1×10^{-3}	1,9	4.964	1.930	3.034
5×10^{-3}	1,2	14.952	9.650	5.302
1×10^{-2}	0,9	24.632	19.300	5.332

Über die Zellmembran folgt eine zweite, deutlich langsamere Komponente: Die intrazelluläre Anreicherung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$.

Die Einstellung eines Gleichgewichts hängt von Inkubationsdauer und gewählter Vanadat-Konzentration im Medium ab: Für Ratten-Herzmuskelzellen wie für Ratten-Herzfibroblasten gilt,

Tab. 4

Intrazelluläre Anreicherung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen.

Anreicherungsfaktoren und maximale Anzahl an Bindungsstellen/Zelle

Eingesetzte $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Radioaktivität/Flasche und Zellprotein-Gehalte:

- a): $0,80 \times 10^6$ cpm; 0,77 mg Protein/Flasche ($1,21 \times 10^6$ Zellen/Flasche).
 b): $0,22 \times 10^6$ cpm; 0,49 mg Protein/Flasche ($0,77 \times 10^6$ Zellen/Flasche).
 c): $0,22 \times 10^6$ cpm; 0,73 mg Protein/Flasche ($1,14 \times 10^6$ Zellen/Flasche).

Temp. = 37°C (a - c). Im Experiment c wurde CMRL + 10 % Pferdeserum + 10 % fetales Kälberserum als Inkubationsmedium verwendet (vgl. 2.7).

Nach weiteren experimentellen Details siehe Legende zu Tab. 3 und unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Experiment	Medium	Inkubationszeit (Std.)	$\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Konzentration im Medium (M)	^{48}V -Anreicherungsfaktor	gebundenes intrazelluläres ^{48}V (pMole/ 10^6 Zellen)	maximale ^{48}V -Bindungsstellen/Zelle
a	HeS	8	1×10^{-8}	41	1,1	
			1×10^{-2}	1,7	45.416	$27,4 \times 10^9$
b (Tab. 3)	HeS	7	$2,5 \times 10^{-8}$	93	6,0	
			1×10^{-2}	0,9	5.332	$3,2 \times 10^9$
c	CMRL+ Serum	11	$2,5 \times 10^{-8}$	18	1,1	
			1×10^{-2}	1,1	8.915	$5,4 \times 10^9$

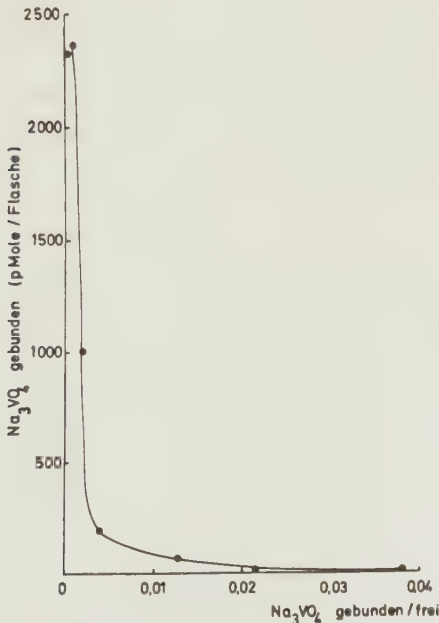
daß bei einer niedrigen Na_3VO_4 -Konzentration wie 10^{-8}M das Äquilibrium erst nach einer Inkubationszeit von 6 bis 7 Stunden erreicht wird (siehe Legende von Tab. 3). Bei einer höheren Konzentration - wie 10^{-4}M - stellt sich eine Gleichgewichtslage bereits nach 60 min. ein (Experiment nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch werden Ratten-Herzmuskelzellen für 7 Stunden bei steigenden Na_3VO_4 -Konzentrationen inkubiert. Anschließend wird die Menge an intrazellulär gebundenem Vanadat gemessen und mit der entsprechenden Na_3VO_4 -Dosis des Mediums in Beziehung gesetzt. Aus dem Quotienten von intra- zu extrazellulärer Vanadat-Konzentration errechnet sich der

intrazelluläre Anreicherungsfaktor (siehe Legende zu Tab. 3), der sich zwischen 93 (bei $2,5 \times 10^{-8} \text{M}$) und 0,9 (bei 10^{-2}M) bewegt (Tab. 3 und 4).

Cantley und Mitarbeiter haben gezeigt (20, 22), daß bei menschlichen Erythrozyten das meiste intrazellulär aufgenommene Na_3VO_4 an Moleküle von hohem Molekulargewicht, vor allem an Hämoglobin, gebunden wird, während die Konzentration an freigelöstem intrazellulärem Vanadat der der externen Inkubations-

Abb. 13

Intrazelluläre Bindung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen (Scatchard Plot)



Identisches Experiment wie in Tab. 3. Die Menge an zellgebundenem Na_3VO_4 /Flasche erhält man durch Multiplizieren des zellgebundenen $\text{Na}_3\text{VO}_4/10^6$ Zellen (siehe Tab. 3) mit der Zellzahl/Flasche ($0,77 \times 10^6$). Der Betrag an freiem Na_3VO_4 /Flasche errechnet sich aus der Na_3VO_4 -Konzentration der Inkubationslösung, Inkubationsvolumen (5 ml) und zellgebundenem Na_3VO_4 /Flasche. Nach weiteren Details siehe Tab. 3.

Tab. 5

$\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Anreicherung und ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen. Einfluß der Hitze-Denaturierung

Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen wurden 15 min. lang in 60°C (D = Denaturiert) bzw. 37°C (K = Kontrolle) warmer HeS vorinkubiert. Daraufhin beobachtete man bei den denaturierten Zellen (= D) ein Sistieren der Kontraktionstätigkeit; ein Ablösen dieser Zellen von ihrer Unterlage trat nicht ein. Anschließend wurden D- und K-Zellen für 7 Std. in $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ (10^{-8}M) bzw. für 10 min. mit $^{86}\text{Rb}^+$ bei 37°C inkubiert. $1,83 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche bzw. $0,24 \times 10^6$ cpm $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ /Flasche eingesetzt; Zellprotein-Gehalt: 1,72 mg Protein/Flasche.

	($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate (nMole/mg Protein x min.)	$\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Anreicherung (fMole/mg Protein)
Kontrolle (K)	23,7	457
Hitze-denaturiert (D)	0,1	303

lösung gleicht. Überträgt man diese Modellvorstellung auf kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur und nimmt an, daß das Vanadat-Transportsystem lediglich eine Angleichung der Na_3VO_4 -Konzentration des Zellwasserraumes an die des Extrazellulärtraumes ermöglicht, so läßt sich die Menge an gebundenem oder komplexiertem Na_3VO_4 errechnen (siehe Legende zu Tab. 3). Es ergibt sich im Experiment der Tab. 3 eine maximale Bindungszahl von $5.300 \text{ pMole}/10^6$ Zellen oder $3,2 \times 10^9$ intrazellulär gebundenen Na_3VO_4 -Molekülen pro Ratten-Herzmuskelzelle. Tab. 4 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus drei Experimenten. Eine Auftragung der Daten aus der Tab. 3 nach Scatchard (142) ergibt eine gekrümmte Kurve (Abb. 13). Zur Interpretation dieses Ergebnisses siehe DISKUSSION (5.1.2).

Denaturiert man kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen durch 15minütige Inkubation bei 60°C , beobachtet man ein sofortiges Sistieren der Kontraktilität. Ein Abrunden oder gar Ablösen der Zellen von ihrem Untergrund bleibt weitgehend aus. Inkubiert man diese vorbehandelten Zellen für 7 Stunden in 10^{-8}M $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$, zeigt sich eine gegenüber dem Kontrollwert mit 66 % immer noch recht hohe Bindung von Vanadat (Tab. 5). Die Bindungsstellen des Na_3VO_4 an zelluläre Strukturen bleiben also weitgehend erhalten, während andererseits thermolabile Enzymsysteme, wie die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase der Zellmembran, völlig zerstört werden (Tab. 5).

4.2 BEEINFLUSSUNG DES KONTRAKTIONSVERHALTENS KULTIVierter RATTEN-HERZMUSKELZELLEN DURCH Na_3VO_4

Die Wirkung vanadiumhaltiger Verbindungen auf das Kontraktionsverhalten kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen soll im folgenden anhand verschiedener Kontraktilitätsparameter dargestellt werden.

4.2.1 Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionsgeschwindigkeit

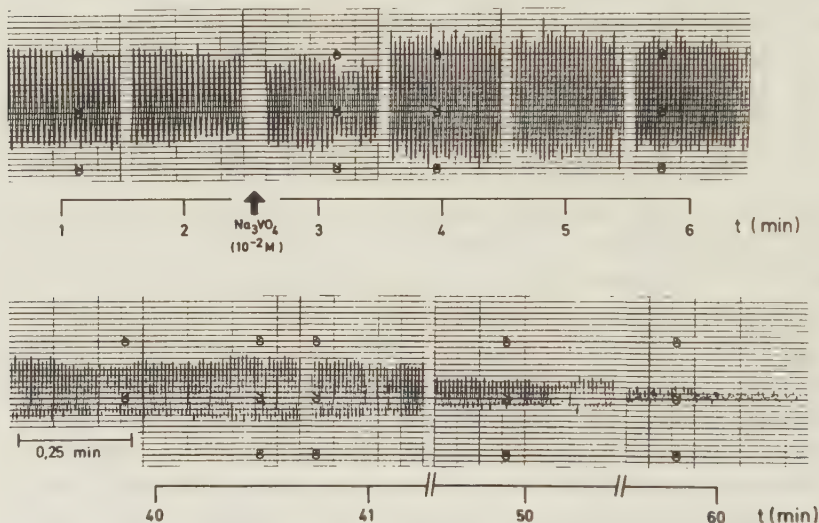
Abb. 14 zeigt die Kontraktionen einer einzelnen, spontan depolarisierenden Ratten-Herzmuskelzelle. Die Aufzeichnung erfolgt dabei durch ein elektrooptisches System, das bereits in MATERIALIEN UND METHODEN vorgestellt wurde (siehe Abb. 7). 1 - 2 Minuten nach Zugabe von Na_3VO_4 (Endkonzentration = 10^{-2}M) beobachtet man eine Zunahme von Schlagfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit. Letztere wird als erste Ableitung der Kontraktionsbewegung gemessen und ist am verlängerten Ausschlag in Ordinatensrichtung (dy/dt) zu erkennen. Bei einer sehr hohen Vanadat-Konzentration - wie hier 10^{-2}M - dauert die Phase erhöhter Kontraktionsfrequenz und -geschwindigkeit lediglich 4 Minuten; es folgen Zeichen von Toxizität (siehe 4.2.4). Führt man obiges Experiment mit geringeren Na_3VO_4 -Konzentrationen durch - wie 10^{-3}M oder 10^{-4}M -, findet man ausschließlich ein Ansteigen von Schlagfrequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit. Der letztere Parameter stellt bei der Arbeit mit kontrahierenden Herzmuskelzellen in Kultur ein Maß für den positiv inotropen Effekt dar (76).

4.2.2 Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionsfrequenz

Mit einem weiteren Experiment (Abb. 15) soll die positiv chronotrope Wirkung von Vanadat in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt werden: Ausgehend von einem Wert von 78/min., steigt die Schlagfrequenz nach Zugabe von Na_3VO_4 (Endkonzentration = 10^{-3}M) kontinuierlich an, um bereits nach 7 Minuten einen Endwert von 124/min. zu erreichen. Wie schon im Experiment der Abb. 14, beobachtet man auch hier eine für (Na_3VO_4) $\geq 10^{-3}\text{M}$ etwa 1 min. lang andauernde Verzögerungsphase, ehe

Abb. 14

Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionstätigkeit einer einzelnen Ratten-Herzmuskelzelle (Zeitabhängigkeit)



Abszisse: Zeit in min.

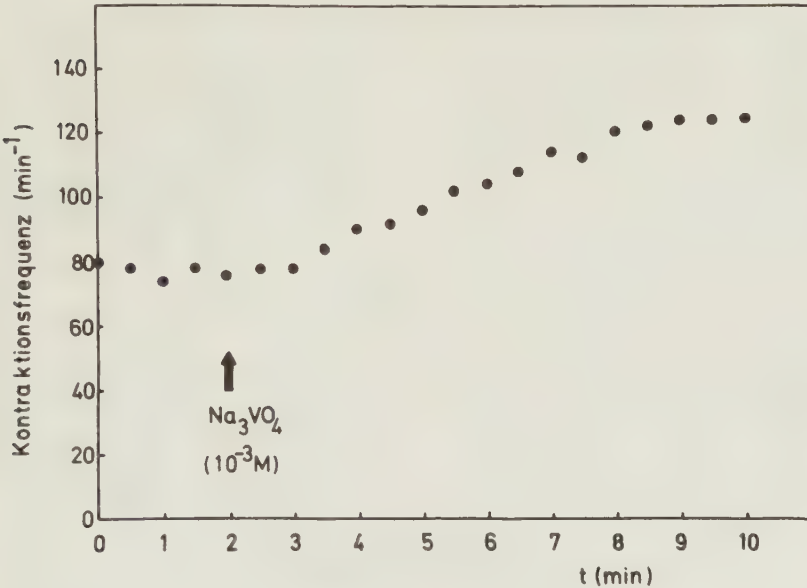
Ordinate: Kontraktionsgeschwindigkeit, Einheit willkürlich gewählt

Die Kontraktilität der Zelle wurde durch ein elektro-optisches System aufgezeichnet, wie in MATERIALIEN UND METHODEN beschrieben. Nach weiteren Einzelheiten siehe Text.

der Wirkungseintritt der zugegebenen Substanz erfolgt. Abb. 16 demonstriert die Zunahme der Kontraktionsfrequenz von Ratten-Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von der Na_3VO_4 -Konzentration. Es handelt sich dabei um das identische Experiment, das bereits aus Tab. 3 bekannt ist. Abb. 16 zeigt eine Zunahme der Schlagfrequenz mit steigender Na_3VO_4 -Konzentration bis zu einem Grenzwert von 10^{-3}M . Bei einer Inkubationsdauer von 7 Stunden beobachtet man den ersten Effekt bei 10^{-5}M , eine halb-maximale Stimulierung bei einer Vanadat-Konzentration von $3 \times 10^{-5}\text{M}$. Bei Konzentrationen $> 10^{-3}\text{M}$ zeigen sich toxische Wirkungen, auf die in 4.2.4 eingegangen wird.

Abb. 15

Zeitabhängigkeit der Na_3VO_4 -Wirkung auf die Kontraktionsfrequenz einer einzelnen kultivierten Ratten-Herzmuskelzelle



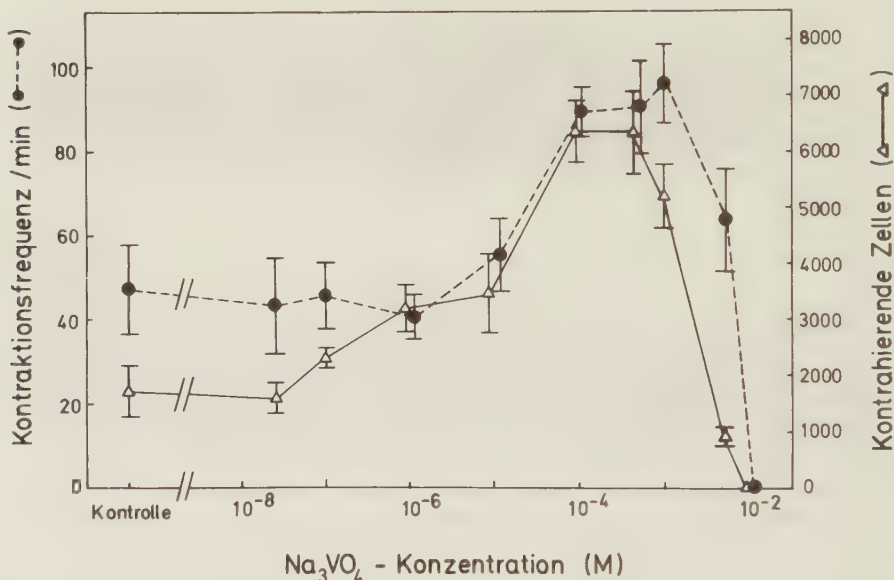
Eine repräsentative Herzmuskelzelle des Gesichtsfeldes (bei 300facher Mikroskop-Vergrößerung) wurde ausgewählt und nach jeweils 30 sec. die Kontraktionsfrequenz bestimmt. Vorinkubation der Zellen für 20 min. in HeS (Temp. = 37°C). Nach Einstellung einer stabilen Kontraktionsfrequenz (78/min.) wurde Na_3VO_4 (Endkonzentration = 10^{-3}M , Temp. = 37°C) zugegeben. Nach weiteren experimentellen Details siehe im Text bzw. unter MATERIALIEN UND METHODEN.

4.2.3 Einfluß von Na_3VO_4 auf die Automatieneigung

Herzmuskelzellkulturen, die aus den Herzen 4 - 6 Tage alter Ratten angelegt wurden, schlagen mit einer langsameren Frequenz und weisen einen höheren Anteil an ruhenden Zellen auf als Präparationen aus den Herzen 1 - 2 Tage alter Tiere (59). Viele dieser Zellen zeigen über einen Zeitraum von 3 Minuten keinerlei Kontraktionen oder imponieren durch zeitweilige Ar-

Abb. 16

Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionstätigkeit kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen (Konzentrationsabhängigkeit)



Abszisse: Na_3VO_4 -Konzentration der Inkubationslösung (HeS)

Ordinate: a): linke Seite (●— — —●)
Kontraktionsfrequenz (min^{-1})

b): rechte Seite (Δ — — — Δ)
Automatieneigung in Zahl der kontrahierenden Zellen/ cm^2

Identisches Experiment wie in Tab. 3. Ratten-Herzmuskelzellen wurden 7 Std. lang in HeS bzw. bei der jeweiligen Na_3VO_4 -Konzentration inkubiert (Temp. = 37°C), dann wurden Schlagfrequenz und Automatieneigung bestimmt. Die Auszählung der kontrahierenden Zellen/ cm^2 wurde bei 300facher Mikroskop-Vergrößerung vorgenommen und dabei pro Meßwert insgesamt 200 Zellen ausgezählt. Bei Berechnung der Gesamtzellzahl pro Kulturfäche ergab sich ein Wert von 8.000 Zellen/ cm^2 . Die Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. ($n=8$) angegeben. Nach weiteren experimentellen Details siehe im Text bzw. unter MATERIALIEN UND METHODEN.

rhythmien. Nach Zugabe von Na_3VO_4 beobachtet man jedoch häufig eine spontane, völlig regelmäßige Schlagfolge. Diese Erhöhung der Automatieneigung in Abhängigkeit von der Vanadat-

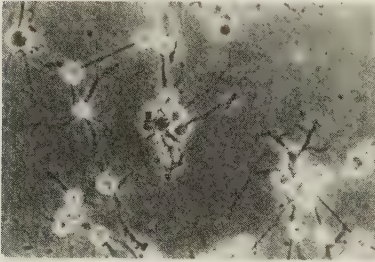
Konzentration soll anhand eines repräsentativen Experiments dargestellt werden (Abb. 16). Wie bereits oben ausgeführt, wurden für diesen Versuch Herzmuskelzellkulturen aus 4 - 5 Tage alten Ratten angelegt, um einen relativ hohen Anteil ruhender, aber trotzdem noch stimulierbarer Herzmuskelzellen zu erhalten. Das Experiment der Abb. 16 zeigt neben der bereits bekannten Steigerung der Schlagfrequenz eine konzentrationsabhängige Zunahme der Automatieneigung. Bei einer Na_3VO_4 -Konzentration von 10^{-7}M ist erstmals die Zahl der kontrahierenden Zellen/cm² gegenüber der Kontrolle erhöht; bei $3 \times 10^{-5}\text{M}$ ergibt sich eine halbmaximale Stimulierung. Vanadat-Konzentrationen $> 10^{-3}\text{M}$ sind bei einer 7-stündigen Inkubationsdauer toxisch (siehe 4.2.4). Anhand von Langzeitexperimenten kann gezeigt werden, daß die dargestellten Wirkungen von Vanadat auf das Kontraktionsverhalten kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen - Zunahme von Kontraktionsgeschwindigkeit, Automatieneigung und Kontraktionsfrequenz - noch 24 Stunden nach Inkubationsbeginn andauern (vgl. Abb. 28).

4.2.4 Toxische Wirkungen von Na_3VO_4 bzw. g-Strophanthin auf Kontraktilität und Morphologie

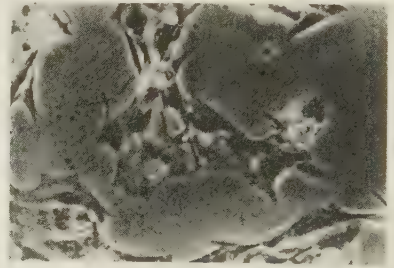
Toxische Wirkungen auf die Kontraktilität schlagender Ratten-Herzmuskelzellen sind abhängig von der gewählten Na_3VO_4 -Konzentration und der Länge der Inkubationsdauer bei der entsprechenden Dosis. Abb. 14 zeigt, daß bei 10^{-2}M Vanadat - also einer sehr hohen Konzentration - gesteigerte Kontraktionsfrequenz und -geschwindigkeit schon nach 4 Minuten von charakteristischen Zeichen der Toxizität abgelöst werden: Die Kontraktionsgeschwindigkeit sinkt wieder ab, es kommt zu Arrhythmien. Nach 60 Minuten beobachtet man nur noch regellose, schwache Kontraktionen über einigen Zellarealen, nach 2 Stunden herrscht Stillstand. Die Konzentrationsabhängigkeit in der Abb. 16 demonstriert exemplarisch für viele andere Experimente, daß es bei Na_3VO_4 -Konzentrationen $> 10^{-3}\text{M}$ und einer Inkubationszeit von mehreren Stunden (hier 7 Stunden) zu einer dramatischen Abnahme von Schlagfrequenz und Automatieneigung (gemessen in schlagende Zellen/cm²) über Arrhythmien bis zum Stillstand der Kontraktionen kommt. Dabei geht die Ratten-Herzmuskel-

Abb. 17

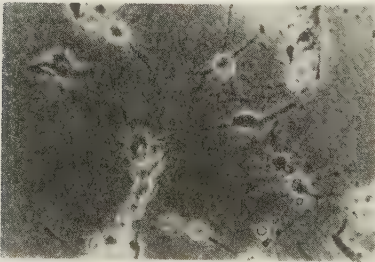
Wirkungen von Na_3VO_4 und g-Strophanthin auf kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen: Morphologische Aspekte



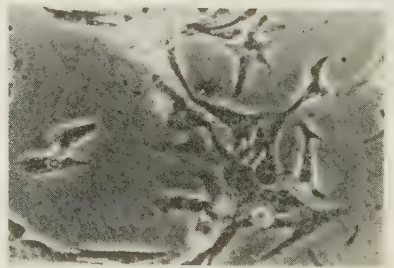
g-Strophanthin (10^{-2}M)



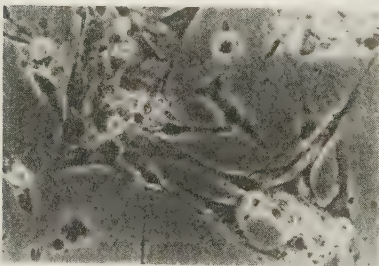
Na_3VO_4 (10^{-2}M)



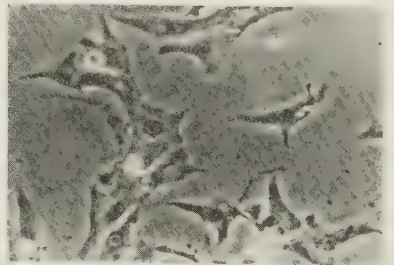
g-Strophanthin (10^{-3}M)



Na_3VO_4 (10^{-3}M)



g-Strophanthin (10^{-3}M) + Na_3VO_4 (10^{-4}M)

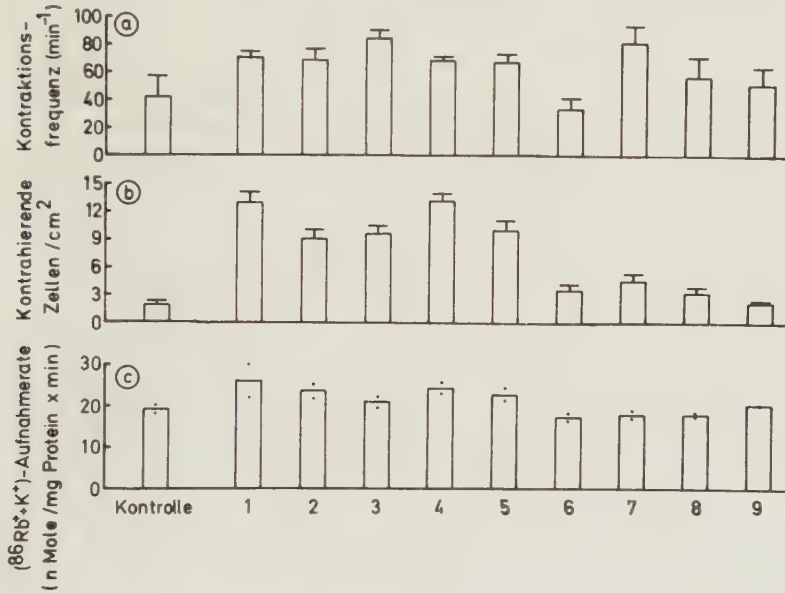


Kontrolle

Vorinkubationszeit 180 min. bei den jeweils angegebenen Bedingungen; Kontraktionsfrequenz (Kontrolle): $127 \pm 12/\text{min.}$ ($m \pm \text{S.D.}$, $n=4$). Zellen in g-Strophanthin, g-Strophanthin + Na_3VO_4 und Na_3VO_4 (10^{-2}M) zeigen ein Sistieren der Kontraktionstätigkeit.

Abb. 18

Einfluß von Na_3VO_4 auf Kontraktionsverhalten und $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen. Vergleich mit verschiedenen Vanadium- und Nicht-Vanadium-Verbindungen



a): Kontraktionsfrequenz (min^{-1})
 b): Zahl der kontrahierenden Zellen/ cm^2
 c): $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate (nMole/mg Protein $\times$ min.)

1 = Na_3VO_4	4 = $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{V}$	7 = KMnO_4
2 = NaVO_3	5 = VCl_3	8 = Na_2SO_4
3 = V_2O_5	6 = $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	9 = NaH_2PO_4

Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur wurden für 60 min. in modifizierter HeS (ohne $0,36\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$) bzw. der 10^{-4}M Lösung der jeweiligen Verbindung (1 - 9) inkubiert; Temp. = 37°C . 5 min. vor Ende der Inkubationsdauer wurden Kontraktionsfrequenz und Zahl der kontrahierenden Zellen/ cm^2 bestimmt, weitere 5 min. später erfolgte die Messung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme; Zellprotein-Gehalt: $0,52\text{ mg Protein/Flasche}$.

ad a): Alle Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. ($n=8$) angegeben.

ad b): Bei der Bestimmung der Zahl der kontrahierenden Zellen/ cm^2 wurden pro Meßwert über 200 Zellen ausgezählt (300fache

Mikroskop-Vergrößerung). Für die Gesamtzellzahl pro Kulturfläche ergab sich ein Wert von 14.000 Zellen/cm². Alle Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (n=8) angegeben.

ad c): $0,63 \times 10^6$ cpm ⁸⁶Rb⁺/Flasche eingesetzt. Bis auf den NaH₂PO₄-Meßwert (Einzelwert) Bestimmung der Meßwerte durch Mittelung der entsprechenden Doppelwerte, die als Punkte gekennzeichnet sind.

zelle nicht in Kontraktur und zeigt nicht die typischen morphologischen Veränderungen, wie sie nach der Applikation toxischer g-Strophanthin-Dosen (10^{-3} M und 10^{-2} M) beobachtet werden (Abb. 17):

Nach dem Sistieren jeglicher Kontraktionstätigkeit imponieren die Zellen durch abgerundete und verdichtete Zelleiber, die radiär übergehen in dünne Zytoplasmafortsätze spinnenbeinartiger Gestalt. Zu diesem Bild der Kontraktur kommt es jedoch nicht in Gegenwart hoher und auch teilweise bereits toxischer Konzentrationen Na₃VO₄ (10^{-3} M und 10^{-2} M) (Abb. 17), obwohl Zeichen von Zytotoxizität - wie Arrhythmien, unkoordinierte Flimmerzustände und schließlich Verlust der Kontraktilität - wie bei den Herzglykosiden (102) beobachtet werden. Zusätzliche Gabe von Na₃VO₄ einer sogar geringeren Konzentration (10^{-4} M) in Gegenwart von g-Strophanthin (10^{-3} M) vermag jedoch die g-Strophanthin-induzierte Kontraktur der kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen zu verhindern (Abb. 17).

4.2.5 Spezifität der Vanadium-Verbindungen auf die Kontraktilität

Die unterschiedlichen Vanadium-Verbindungen, wie sie in Tab. 2 aufgeführt sind, zeigen ein ähnliches Verhalten nicht nur im Hinblick auf den Vanadat-Transport über die Zellmembran, sondern auch bezüglich der (⁸⁶Rb⁺+K⁺)-Aufnahmerate und der Wirkung auf die Kontraktilität der untersuchten Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur (Abb. 18). Alle getesteten Vanadium-Derivate - ebenso KMnO₄ - bewirken ein signifikantes Ansteigen der Kontraktionsfrequenz, während nach Gabe von Na₂MoO₄ · 2H₂O, Na₂SO₄ oder NaH₂PO₄ (Endkonzentration = 10^{-4} M) dieser positiv chronotrope Effekt ausbleibt (Abb. 18 a). Weiterhin beobachtet man bei Inkubation der Herzmuskelzellen in einer der auf-

geführten Vanadium-Verbindungen eine deutliche Stimulierung der Automatieneigung. Im Gegensatz dazu bewegt sich die Zahl der kontrahierenden Zellen/cm² bei chemisch ähnlich wie Vanadat konfigurierten Ionen - wie Molybdat, Permanganat, Sulfat und Phosphat - im Bereich des Kontrollwertes (Abb. 18 b). Somit scheint die demonstrierte Modifizierung des Kontraktionsverhaltens von Ratten-Herzmuskelzellen relativ spezifisch für alle vanadiumhaltigen Verbindungen zu sein aufgrund ihres chemischen Verhaltens (siehe auch DISKUSSION).

4.3 EINFLUSS VON Na₃VO₄ AUF DEN TRANSMEMBRANÄREN FLUSS MONOVALENTER KATIONEN UND DIE ZELLULÄREN ELEKTROLYT-GEHALTE KULTIVierter HERZZELLEN

Wie in Kapitel 4.2 demonstriert wurde, vermögen vanadiumhaltige Verbindungen das Kontraktionsverhalten kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen in ähnlicher Weise zu beeinflussen, wie man dies von Herzglykosiden kennt (76, 102). Weiterhin ist Vanadat - wie auch die Herzglykoside - ein potenter Inhibitor der isolierten (Na⁺+K⁺)-ATPase (19, 21, 68, 92). Dieses Enzym reguliert den aktiven Na⁺- und K⁺-Transport über die Zellmembran (156, 158). Im Hinblick auf eine eventuell bestehende Analogie zu den Herzglykosiden soll der Einfluß von Na₃VO₄ auf die aktiven und passiven transmembranären Ionenflüsse sowie die zellulären Gehalte an Na⁺- und K⁺-Ionen an verschiedenen kultivierten Herzzelltypen untersucht werden.

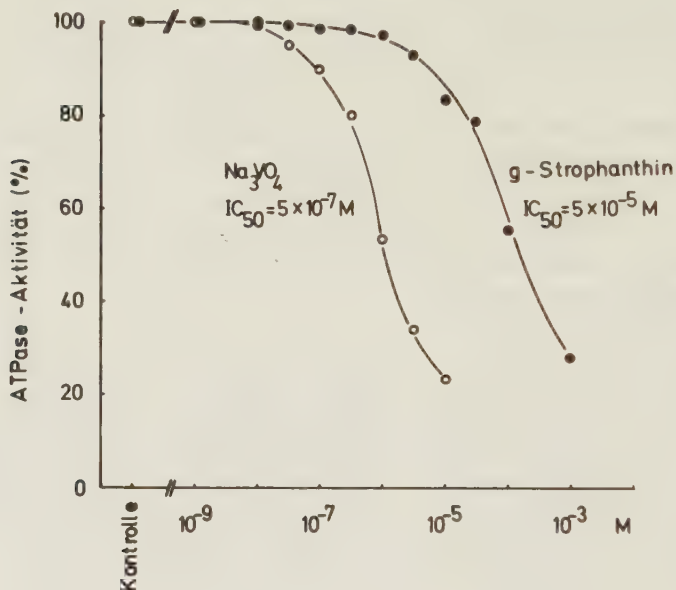
4.3.1 Vergleich der Wirkungen von Na₃VO₄ und g-Strophanthin auf die (⁴²K⁺)-bzw. ⁸⁶Rb⁺)-Aufnahme verschiedener kultivierter Herzzellen

Wirkungen von Na₃VO₄ und g-Strophanthin auf die (⁴²K⁺)- bzw. (⁸⁶Rb⁺)-Aufnahme kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen, fibroblastoider Ratten-Herzzellen und menschlicher Girardi-Herzzellen

Die physiologische Aktivität der Na⁺-Pumpe lebender Zellen kann über die Messung entweder des aktiven K⁺-Einstroms oder des Na⁺-Ausstroms bestimmt werden. Zur Messung des transmembranären K⁺-Flusses können ⁴²K⁺ oder ⁸⁶Rb⁺ als K⁺-Analogon verwendet werden (siehe 2.5).

Abb. 19

Konzentrationsabhängige Inhibierung der Ratten-Herz-ATPase-Aktivität durch Na_3VO_4 und g-Strophanthin



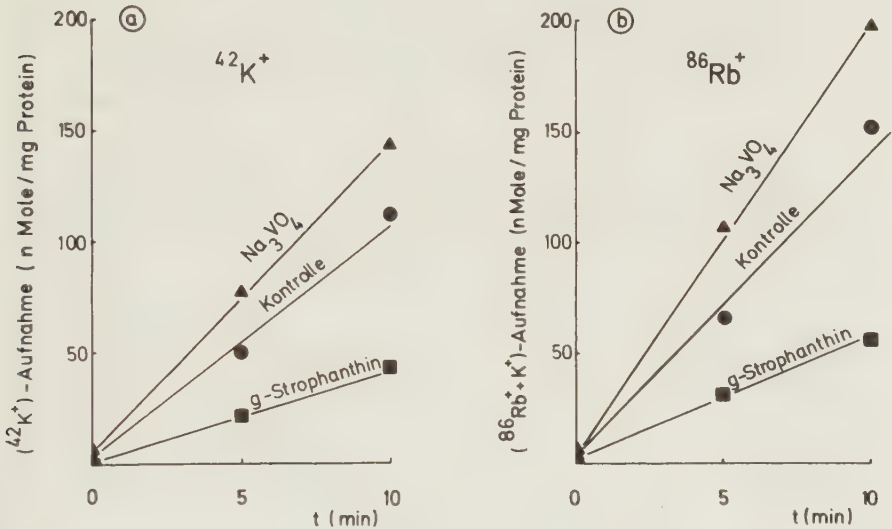
Zellmembranen (0,6 - 1,0 mg Protein, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität 0,22 U/mg Protein) wurden im gekoppelten optischen Test-Gemisch (146) 60 min. lang bei 37°C mit den angegebenen g-Strophanthin- bzw. Na_3VO_4 -Konzentrationen inkubiert. Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter 2.8 bzw. unter (47). Dieses Experiment entstand in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. Philipp aus unserer Arbeitsgruppe.

Die Kinetiken der Abb. 20 demonstrieren für beide Tracer (Abb. 20 a: $^{42}\text{K}^+$; Abb. 20 b: $^{86}\text{Rb}^+$) den Einfluß von Na_3VO_4 bzw. Herzglykosiden auf den K^+ -Einstrom in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur.

Korrelierend mit der Hemmung der isolierten $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (Abb. 19) aus demselben Ausgangsmaterial, vermindert g-Strophanthin in hoher Dosierung (10^{-3}M) die $(^{42}\text{K}^+)\text{-Aufnahmerate}$ kultivierter Herzmuskelzellen auf 39 % (Abb. 20 a). Nach Gabe von Vanadat zeigt sich in vitro - analog zu den Herzglykosiden - eine konzentrationsabhängige Inhibition der Enzym-

Abb. 20

Kinetiken der ($^{42}\text{K}^+$)- bzw. ($^{86}\text{Rb}^+$)-Aufnahme in kultivierte, kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin



a): Bestimmung der ($^{42}\text{K}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate mit $^{42}\text{K}^+$
 b): Bestimmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate mit $^{86}\text{Rb}^+$

Vorinkubation der Zellen für 180 min. in HeS oder in 10^{-3}M Na_3VO_4 bzw. g-Strophanthin; Temp. = 37°C . $3,8 \times 10^6$ cpm ($^{42}\text{K}^+$) bzw. $1,8 \times 10^6$ cpm ($^{86}\text{Rb}^+$) pro Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 0,54 mg Protein/Flasche. Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

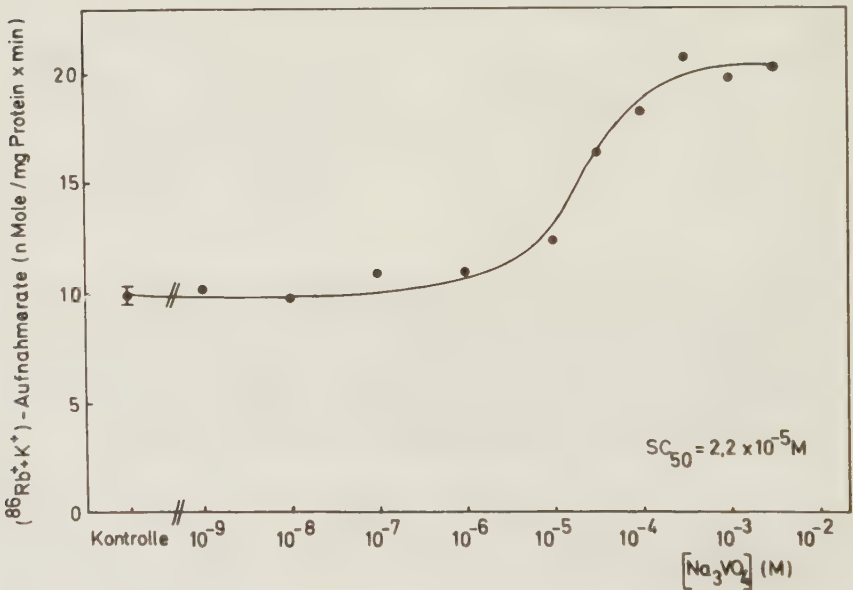
aktivität (Abb. 19). Dagegen beobachtet man bei Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur, die aus denselben Herzen wie die Enzympräparation gewonnen wurden, in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-3}M) keine Hemmung, sondern eine Stimulierung der ($^{42}\text{K}^+$)-Einstromrate auf 129 % des Kontrollwertes (Abb. 20 a). Führt man das identische Experiment mit $^{86}\text{Rb}^+$ anstatt $^{42}\text{K}^+$ als radioaktiven Tracer durch (Abb. 20 b), erhält man ähnliche Ergebnisse: Verminderung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate durch g-Strophanthin

auf 36 %, jedoch Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate in Gegenwart von Vanadat auf 130 %.

Dieser Effekt ist abhängig von der gewählten Na_3VO_4 -Konzentration. Abb. 21 zeigt für kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen, daß durch Vanadat die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate gegenüber dem Kontrollwert auf 204 % gesteigert werden kann; die halbmaximale Stimulierung liegt bei einer Na_3VO_4 -Konzentration von 22 μM . Bei Berücksichtigung weiterer Experimente (n=12) findet sich bei einer Vanadat-Dosis von 10^{-4}M eine mittlere Steigerung

Abb. 21

Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur (Konzentrationsabhängigkeit)



Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur wurden für 420 min. in HeS bzw. der jeweiligen Na_3VO_4 -Konzentration vorinkubiert; Temp. = 37°C. Dann erfolgte die Bestimmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme; $1,02 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 0,71 mg Protein/Flasche. Weitere experimentelle Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms von $47 \pm 8 \%$ ($m \pm \text{S.E.M.}$) für kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur. Bezüglich dieser Zellart soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß eine Na_3VO_4 -induzierte Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme - wie sie von in vitro-Untersuchungen her zu erwarten wäre (Abb. 19) - weder im Experiment der Abb. 21 noch in irgendeinem anderen Versuch bei einem sorgfältig ausgetesteten Konzentrationsbereich von 10^{-9}M bis 10^{-3}M Na_3VO_4 beobachtet werden konnte.

Tab. 6

Zelluläre K^+ - und Na^+ -Gehalte und ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten in verschiedenen kultivierten Herzzelltypen. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin

Zelltyp	Zellulärer K^+ -Gehalt (nMole/mg Protein)		
	Kontrolle	Na_3VO_4	g-Strophanthin
I	547 $\pm$ 30	639 $\pm$ 26	130 $\pm$ 8
II	599 $\pm$ 35	673 $\pm$ 51	69 $\pm$ 20
III	660 $\pm$ 53	556 $\pm$ 67	198 $\pm$ 23
IV	617 $\pm$ 28	500 $\pm$ 39	47 $\pm$ 14
V	491 $\pm$ 39	586 $\pm$ 31	264 $\pm$ 17
Zelltyp	Zellulärer Na^+ -Gehalt (nMole/mg Protein)		
	Kontrolle	Na_3VO_4	g-Strophanthin
I	27 $\pm$ 7	23 $\pm$ 3	144 $\pm$ 11
II	54 $\pm$ 3	40 $\pm$ 4	436 $\pm$ 19
Zelltyp	($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate (nMole/mg Protein x min.)		
	Kontrolle	Na_3VO_4	g-Strophanthin
I	9,0	15,0	3,6
II	7,9	10,6	1,4
III	8,4	5,9	6,7
IV	14,9 $\pm$ 0,3	9,7 $\pm$ 1,5	9,0 $\pm$ 1,0
V	6,5 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1

- I Ratten-Herzmuskelzellen
- II Menschliche Girardi-Herzzellen
- III Meerschweinchenherz-Nichtmuskelzellen
- IV Hühnerherz-Nichtmuskelzellen
- V Rattenherz-Nichtmuskelzellen

Der zelluläre K^+ -Gehalt wurde durch Flammenphotometrie (I, II, IV, V) bzw. für Zelltyp III durch Messung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme unter Gleichgewichtsbedingungen (3 Std.) bestimmt, der zellu-

läre Na^+ -Gehalt durch Messung der $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme unter Gleichgewichtsbedingungen (260 min. für Zelltyp I, 250 min. für Zelltyp II). (Na_3VO_4) = $3 \times 10^{-4}\text{M}$ (I, II, III) bzw. 10^{-3}M (IV, V); (g-Strophanthin) = 10^{-3}M (I - V). Die Werte für den zellulären K^+ - bzw. Na^+ -Gehalt sind als Mittelwerte $\pm$ S.D. ($n=4-10$) angegeben; die Werte für die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate sind Mittelwerte eng korrelierender Doppelwerte (I, II, III) bzw. Mittelwerte $\pm$ S.D. ($n=3$) bei den Zelltypen IV und V. Vorinkubationszeiten, eingesetzte Radioaktivität an $^{86}\text{Rb}^+$ bzw. $^{22}\text{Na}^+$ und Zellprotein-Gehalt/Flasche:

I	260 min.;	$3,12 \times 10^6$	cpm;	$18,52 \times 10^6$	cpm;	0,67 mg
II	250 min.;	$1,63 \times 10^6$	cpm;	$17,57 \times 10^6$	cpm;	1,03 mg
III	240 min.;	$1,32 \times 10^6$	cpm ($^{86}\text{Rb}^+$),			0,78 mg
IV	240 min.;	$2,38 \times 10^6$	cpm ($^{86}\text{Rb}^+$);			0,26 mg
V	240 min.;	$1,41 \times 10^6$	cpm ($^{86}\text{Rb}^+$);			1,30 mg

Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Die Stimulierung des K^+ -Influxes in Gegenwart von Vanadat ist kein ausschließlich auf kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen beschränktes Phänomen:

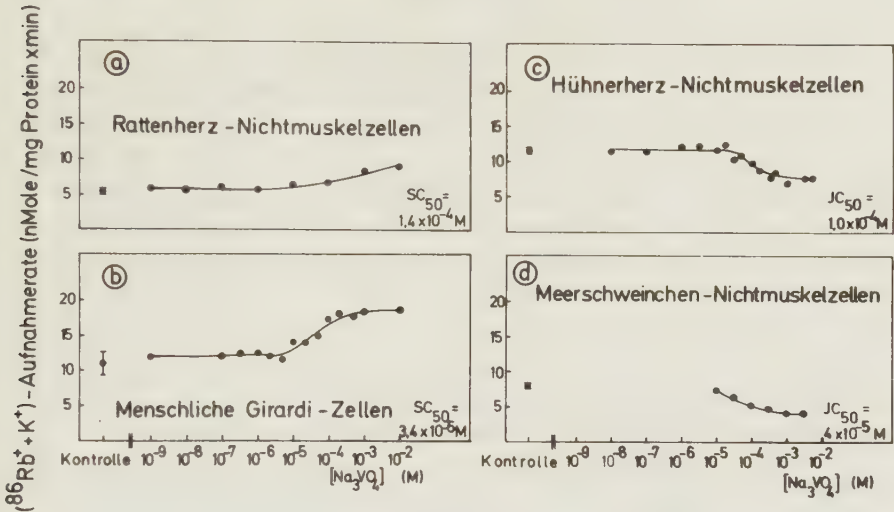
In Experimenten mit fibroblastoiden Ratten-Herzzellen bzw. Girardi-Zellen - einer epitheloid wachsenden, transformierten Zelllinie des menschlichen Vorhofs (64) - beobachtet man in Anwesenheit von Na_3VO_4 (10^{-3}M bzw. $3 \times 10^{-4}\text{M}$) eine Steigerung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate auf 120 % bzw. 134 % des Kontrollwertes (Tab. 6), während die g-Strophanthin-Hemmbarkeit des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms weiterhin gegeben ist (Tab. 6).

Trägt man die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate gegen steigende Na_3VO_4 -Konzentrationen auf, so zeigt sich für fibroblastoide Ratten-Herzzellen eine Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate bis zu 162 %; die Vanadat-Konzentration zur halbmaximalen Stimulierung beträgt 140 μM (Abb. 22 a). Bei menschlichen Girardi-Herzzellen beobachtet man ebenfalls eine Erhöhung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstromrate auf maximal 165 %; die halbmaximale Stimulierung liegt bei 34 μM Na_3VO_4 (Abb. 22 b).

Die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur erscheint nicht nur in Gegenwart von Na_3VO_4 gesteigert, sondern wird durch eine Reihe weiterer vanadiumhaltiger Verbindungen ebenfalls stimuliert, wie NaVO_3 , V_2O_5 , $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5\text{V}$ und VCl_3 (Endkonzentration = 10^{-4}M) (Abb. 18 c). Dagegen kann bei Inkubation derselben Zellen mit Anionen ähnlicher

Abb. 22

Konzentrationsabhängige Stimulierung bzw. Inhibierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme durch Na_3VO_4 bei unterschiedlichen Herzzelltypen



- a): Rattenherz-Nichtmuskelzellen
 b): Menschliche Girardi-Herzzellen
 c): Hühnerherz-Nichtmuskelzellen
 d): Meerschweinchenherz-Nichtmuskelzellen

Vorinkubation der Zellen in HeS bzw. der jeweiligen Na_3VO_4 -Konzentration für 60 min. (a), 150 min. (b), 240 min. (c) bzw. 240 min. (d); Temp. = 37°C . Dann erfolgte die Bestimmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme; dabei wurden eingesetzt: $0,95 \times 10^6$ cpm (a), $3,23 \times 10^6$ cpm (b), $3,68 \times 10^6$ cpm (c) bzw. $1,80 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche (d). Zellprotein-Gehalte in mg Protein/Flasche: 0,89 (a), 0,60 (b), 0,18 (c) bzw. 0,34 (d). Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

chemischer Konfiguration, wie Molybdat, Permanganat, Sulfat und Phosphat (Endkonzentration = 10^{-4} M), keine Erhöhung des $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Einstroms festgestellt werden (Abb. 18 c). Die Spezifität der Wirkung vanadiumhaltiger Verbindungen, wie sie bereits für den Vanadat-Aufnahmemechanismus (Tab. 2) und die Na_3VO_4 -induzierte Modifikation des Kontraktionsverhaltens (Abb. 18 a + b) demonstriert werden konnte, gilt also auch für die $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen. Aufgrund der komplexen Vanadium-Chemie (113, 139) muß jedoch in

Betracht gezogen werden, daß es sich bei den jeweils zugegebenen unterschiedlichen Vanadium-Salzen in gelöstem Zustand wohl um ein und dieselbe Verbindung in ionisierter Form handelt (siehe auch DISKUSSION).

Der Einstrom von K^+ -Ionen in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen geschieht einmal durch ein aktives, g-Strophanthin-hemmbares Transportsystem - dargestellt durch die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase der Zellmembran -, zum anderen über einen passiven, g-Strophanthin-unempfindlichen Aufnahmevorgang (117). In Gegenwart von Na_3VO_4 wird der g-Strophanthin-inhibierbare Anteil des $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Einstroms stimuliert, wie das folgende Experiment (Tab. 7) beweist:

Tab. 7

Einfluß von g-Strophanthin auf die Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen und menschlicher Girardi-Herzzellen in Kultur

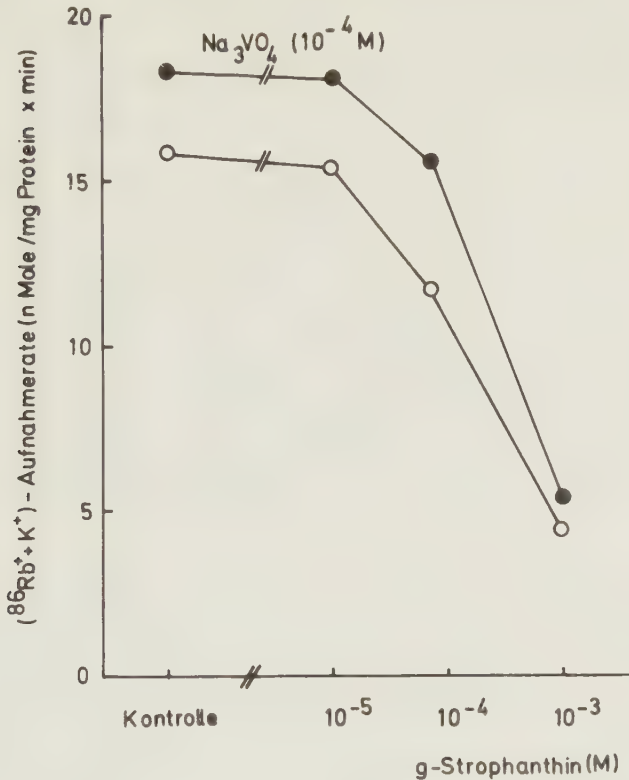
Vorinkubation der Zellen für 60 min. in HeS (jedoch mit $(K^+) = 2,5$ mM), Na_3VO_4 ($10^{-4}M$), g-Strophanthin ($10^{-3}M$) bzw. Na_3VO_4 ($10^{-4}M$) + g-Strophanthin ($10^{-3}M$); Temp. = $37^\circ C$. Danach Bestimmung der $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahmerate; dabei wurden für beide Zellarten $0,61 \times 10^6$ cpm $^{86}Rb^+$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalte: 1,09 mg Protein/Flasche (Ratten-Herzmuskelzellen) bzw. 1,13 mg Protein/Flasche (Girardi-Herzzellen). Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Inkubationsbedingungen	$(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahmerate			
	Ratten-Herzmuskelzellen		Girardi-Herzzellen	
	nMole/mg Protein x min.	%	nMole/mg Protein x min.	%
Kontrolle	14,4	100	7,8	100
Na_3VO_4	17,1	119	10,3	132
g-Strophanthin	8,9	62	4,5	58
Na_3VO_4 + g-Strophanthin	8,8	61	4,6	59

Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen bzw. menschliche Girardi-Zellen werden 60 min. lang in Na_3VO_4 ($10^{-4}M$), g-Strophanthin ($10^{-3}M$) bzw. der Kombination dieser Substanzen inkubiert. Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend für beide Zellarten, daß die

Abb. 23

Konzentrationsabhängige Verhinderung der Na_3VO_4 -induzierten Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen durch g-Strophanthin



Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur wurden für 180 min. in HeS bzw. in Gegenwart ansteigender g-Strophanthin-Konzentrationen ($10^{-5}\text{M} - 10^{-3}\text{M}$) ohne oder mit Na_3VO_4 (10^{-4}M) vorinkubiert; Temp. = 37°C . Danach Bestimmung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme, dabei wurden $0,86 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: $0,75$ mg Protein/Flasche. Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Vanadat-induzierte Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme bei gleichzeitiger g-Strophanthin-Gabe verhindert werden kann (Tab. 7).

In einem ähnlichen Experiment (Abb. 23) werden kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen 3 Stunden lang bei steigenden Konzen-

trationen g-Strophanthin inkubiert. Man beobachtet eine konzentrationsabhängige Verminderung des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms; so sind maximal etwa 70 % der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme durch hohe Herzglykosid-Konzentrationen hemmbar. In Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-4}M) ist dagegen der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx gesteigert. Diese Stimulierung wird durch gleichzeitige Gabe von g-Strophanthin konzentrationsabhängig zurückgenommen und bei einer Konzentration von 10^{-3}M g-Strophanthin sogar völlig verhindert (Abb. 23).

Die dargestellten Experimente zeigen übereinstimmend die Hemmbarkeit der Vanadat-induzierten Stimulierung des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms durch Herzglykoside. Dieser Befund spricht für eine Stimulierung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in Gegenwart von Na_3VO_4 .

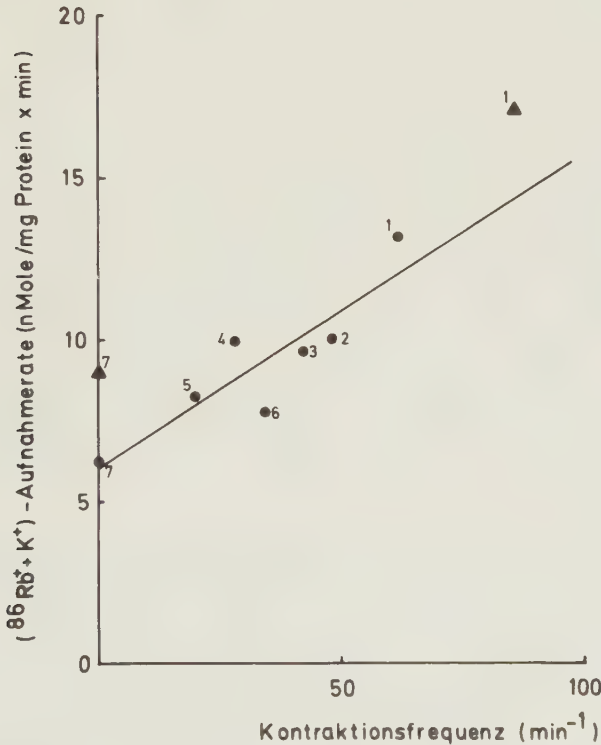
Yamamoto und Mitarbeiter konnten zeigen, daß im Meerschweinchen-Papillarmuskel die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate mit steigender Kontraktionsfrequenz deutlich zunimmt (183). Da in Ratten-Herzmuskelzellen ebenfalls eine Stimulierung der Frequenz beobachtet wird (Abb. 15, Abb. 16, Abb. 18), wäre dieser Effekt möglicherweise eine Erklärung für einen erhöhten ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx.

Durch Applikation von D 600 bzw. verschiedener chronotroper Verbindungen (Endkonzentration = 10^{-4}M), wie BaCl_2 , CoCl_2 , K_2CrO_4 , MnCl_2 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und ZnCl_2 - alleine oder in Kombination mit 10^{-4}M Na_3VO_4 - wurde der Einfluß der Kontraktionsfrequenz auf die Vanadat-induzierte Stimulation der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme untersucht (Abb. 24). Dieses Experiment zeigt mehrere Sachverhalte auf:

1. Die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate steigt mit zunehmender Kontraktionsfrequenz an. Zwischen beiden Meßgrößen besteht eine lineare Beziehung ($r = 0,89$), wie die eingezeichnete Gerade in Abb. 24 zeigt.
2. Zusätzliche Applikation von Vanadat erhöht Kontraktionsfrequenz und ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstrom der untersuchten Herzmuskelzellen. Diese Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kann nicht allein auf eine gesteigerte Schlagfrequenz zurückgeführt werden: Der Abstand in Ordinatenrichtung zwischen dem Meßpunkt für die getestete Substanz + Na_3VO_4 und der eingezeichneten Geraden markiert genau den Betrag, um

Abb. 24

Einfluß der Kontraktionsfrequenz kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen auf die Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate



- | | |
|--|---|
| ● : ohne Na_3VO_4 | ▲ : mit Na_3VO_4 (10^{-4}M) |
| 1 = Kontrolle | 5 = MnCl_2 (10^{-4}M) |
| 2 = BaCl_2 (10^{-4}M) | 6 = $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10^{-4}M) |
| 3 = CoCl_2 (10^{-4}M) | 7 = ZnCl_2 (10^{-4}M) |
| 4 = K_2CrO_4 (10^{-4}M) | |

Geradengleichung für 1 - 7 (ohne Na_3VO_4):

$$y = 0,097 x + 6,04; \quad r = 0,89$$

Kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen wurden für 30 min. in HeS (1) bzw. der 10^{-4}M Lösung der jeweiligen Verbindung (2 - 7) vorinkubiert, 1 und 7 sowohl in Ab- wie in Anwesenheit von Na_3VO_4 (10^{-4}M); Temp. = 37°C . 5 min. vor Ende der Inkubations-

zeit erfolgte die Auszählung der Kontraktionsfrequenz (300fache Mikroskop-Vergrößerung, Angabe in Mittelwerten $\pm$ S.D., $n=3$). Weitere 5 min. später wurde dann die Bestimmung der $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahmerate vorgenommen ($1,67 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt); Zellprotein-Gehalt: 0,71 mg Protein/Flasche.

In einem ähnlichen Experiment wurde in Gegenwart von D 600 (10^{-5}M) + Na_3VO_4 (10^{-4}M) ebenfalls ein Sistieren der Kontraktionstätigkeit beobachtet; die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate wurde durch Na_3VO_4 von 7,4 auf 9,0 nMole/mg Protein $\times$ min., also um 22 %, gesteigert.

Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

den der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx - unabhängig von der Kontraktionsfrequenz - stimuliert wird.

3. In Gegenwart von ZnCl_2 (10^{-4}M) bzw. D 600 (10^{-5}M) sistieren die spontanen Kontraktionen kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen (Abb. 24). Zusätzliche Gabe von Na_3VO_4 bewirkt zwar keine Anregung der Kontraktionstätigkeit, aber eine Erhöhung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate (Abb. 24). Somit ist der beobachtete Vanadat-Effekt nur zum Teil auf eine Beeinflussung der Kontraktionsfrequenz bzw. auf eine Änderung der Automatieneigung der kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur zurückzuführen.

Wirkungen von Na_3VO_4 und g-Strophanthin auf die ($^{86}\text{Rb}^+$)-Aufnahme fibroblastöider Hühner- bzw. Meerschweinchen-Herzzellen in Kultur

Die Stimulierung der aktiven K^+ -Aufnahme lebender Ratten-Herzmuskelzellen in Gegenwart von Na_3VO_4 (Abb. 20, Abb. 21) steht im Widerspruch zur gleichzeitigen Hemmung der isolierten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (Abb. 19). Um diese Diskrepanz der Vanadat-Wirkungen besser verstehen zu lernen, wurde der Einfluß von Na_3VO_4 auf den Ionenfluß weiterer Herzzelltypen untersucht.

Fibroblastoide Zellen, die aus den Herzen neonataler Meerschweinchen- bzw. Hühner-Embryonen isoliert wurden, zeigen in Gegenwart von g-Strophanthin (10^{-3}M) eine Abnahme ihres ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms auf 80 % bzw. 60 % (Tab. 6). Bei Inkubation derselben Zellen in $3 \times 10^{-4}\text{M}$ bzw. $1 \times 10^{-3}\text{M}$ Na_3VO_4 beobachtet man keine Stimulierung, sondern eine Verminderung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate auf 70 % bzw. 65 % des Kontrollwertes

(Tab. 6). Die hemmende Wirkung steigender Vanadat-Konzentrationen auf die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate verdeutlicht Abb. 22 - c für fibroblastoide Meerschweinchen-Herzzellen, d für fibroblastoide Hühner-Herzzellen: Halbmaximale Inhibierung findet man bei 40 μM bzw. 100 μM Na_3VO_4 , während die maximale Vanadat-induzierte Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstromrate auf 50 % bzw. 66 % des Ausgangswertes mit der durch g-Strophanthin erreichbaren Inhibierung vergleichbar ist (Abb. 22 c + d).

4.3.2 Vergleich der Wirkungen von Na_3VO_4 und g-Strophanthin auf die zellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte kultivierter Herzzellen

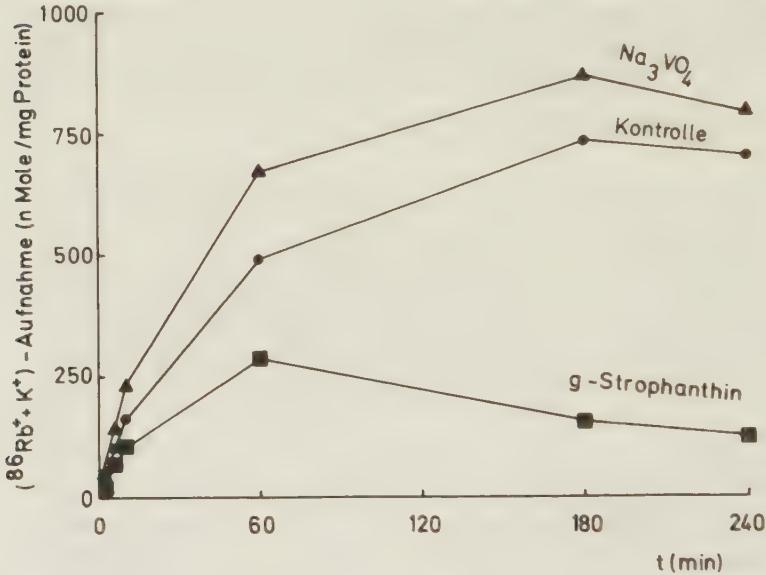
Die unterschiedliche Beeinflussung - Stimulierung wie Inhibierung - der aktiven ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme kultivierter Herzzellen in Gegenwart von Na_3VO_4 bzw. g-Strophanthin sollte auch Veränderungen der zellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte zur Folge haben.

Für die Messung des intrazellulären K^+ -Gehaltes können zwei unterschiedliche Methoden angewandt werden, die vergleichbare Ergebnisse liefern: Bestimmung von K^+ durch Flammenphotometrie und Messung des intrazellulären Gehaltes an frei austauschbaren K^+ -Ionen mit $^{42}\text{K}^+$ bzw. $^{86}\text{Rb}^+$ unter Gleichgewichtsbedingungen, die für alle verwendeten Isotope nach ≥ 3 Stunden vorliegen (vgl. Abb. 25 bzw. unter 2.6).

Tab. 6 stellt für kultivierte Herzzellen unterschiedlicher Spezies die Wirkungen von Vanadat und g-Strophanthin auf die intrazellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte dar, wobei im identischen Experiment die jeweilige ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate mitbestimmt wurde. Die Messung des Zell-Kaliums erfolgte durch Flammenphotometrie bzw. durch Markierung mit $^{86}\text{Rb}^+$. Der intrazelluläre Spiegel an austauschbarem Na^+ wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem $^{22}\text{Na}^+$ nach derselben Methodik wie mit $^{86}\text{Rb}^+$ ermittelt. In Kenntnis der Hemmung sowohl der isolierten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (Abb. 19) als auch der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme (Tab. 6, Abb. 20 und 23) ist in Gegenwart höherer Herzglykosid-Konzentrationen eine Senkung des intrazellulären K^+ -Gehaltes und eine gleichzeitige Erhöhung des Zell-Natriums in allen darauf untersuchten Zelltypen zu erwarten (Tab. 6, Abb. 26).

Abb. 25

Zeitabhängige Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin



Vorinkubation der Zellen für 60 min. in HeS, 10^{-3}M Na_3VO_4 bzw. 10^{-3}M g-Strophanthin. Dann Zugabe von $^{86}\text{Rb}^+$ ($0,85 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt) für die jeweilige Inkubationszeit. Zellprotein-Gehalt: 0,79 mg Protein/Flasche. Alle Werte sind Mittelwerte eng korrelierender Doppelwerte. Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Auch die beobachteten Effekte von Vanadat können von der Wirkung dieser Verbindung auf den ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstrom - wie bereits in den Abb. 20, 21 und 22 demonstriert - hergeleitet werden: Durch die Vanadat-induzierte Stimulierung des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxes in Ratten-Herzmuskelzellen, fibroblastoide Ratten-Herzzellen und menschliche Girardi-Zellen steigt der intrazelluläre K^+ -Gehalt jeweils um 17 %, 19 % bzw. 12 % an (Tab. 6, Abb. 25). Bei simultaner Gabe von Na_3VO_4 und g-Strophanthin sinkt der intrazelluläre K^+ -Spiegel bei kontrahierenden Herzmuskelzellen bzw. fibroblastoiden Herzzellen der Ratte auf

einen Wert ab, wie er auch nach Inkubation der Zellen mit hohen Herzglykosid-Konzentrationen alleine erreicht wird (Experimente nicht gezeigt). Dieses Ergebnis korreliert mit dem Befund, daß durch Gabe hoher g-Strophanthin-Dosen die Vanadat-induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme verhindert wird (Tab. 7 und Abb. 23).

Gleichzeitig mit dem Anstieg der intrazellulären K^+ -Konzentration in Gegenwart von Na_3VO_4 beobachtet man ein geringes Absinken des Na^+ -Spiegels (Tab. 6). Dieser Effekt konnte jedoch nicht in allen durchgeführten Experimenten bestätigt werden: Neben der beschriebenen Senkung des intrazellulären Na^+ -Gehalts wurde auch ein Gleichbleiben des Zell-Natriums gegenüber dem Kontrollwert gesehen (Experimente nicht gezeigt).

In fibroblastoiden Herzzellen von Meerschweinchen bzw. Hühnern wird der intrazelluläre K^+ -Gehalt durch Vanadat auf 84 % bzw. 81 % des Ausgangswertes gesenkt. Obwohl Na_3VO_4 wie g-Strophanthin in beiden Zellarten die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in etwa gleichem Ausmaß hemmen, übertrifft die Herzglykosid-induzierte Verminderung des Zell-Kaliums bei weitem die durch Vanadat verursachte (Tab. 6).

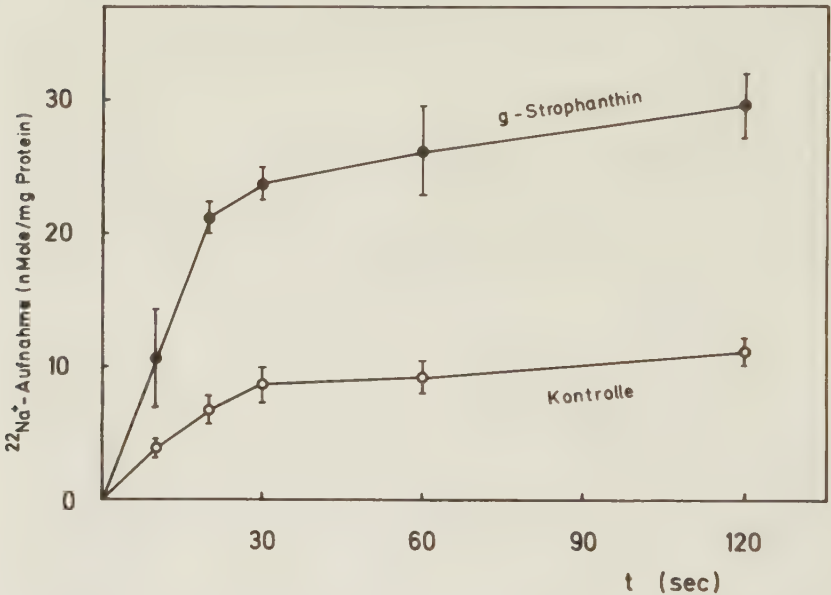
4.3.3 Wirkungen von Na_3VO_4 bzw. g-Strophanthin auf den Na^+ -Einstrom in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur

Um den Mechanismus der Vanadat-Wirkung auf den transmembranären Fluß monovalenter Kationen zu charakterisieren, wurde der Einstrom von Na^+ -Ionen in kultivierte Herzzellen untersucht.

Abb. 26 demonstriert die Aufnahme von $^{22}\text{Na}^+$ in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen. Diese Aufnahme zeigt sich nur in den ersten Sekunden linear bei einer $T_{1/2}$ von 15 - 30 sec. (vgl. (117)); deshalb erfolgt die Bestimmung der $^{22}\text{Na}^+$ -Influxrate nur in diesem Bereich. In Gegenwart hoher g-Strophanthin-Konzentrationen kommt es sowohl zu einer Zunahme der $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme-Geschwindigkeit als auch zu einer Erhöhung des intrazellulären $^{22}\text{Na}^+$ -Gehaltes (vgl. (55)). Abb. 26 zeigt diese gesteigerte $^{22}\text{Na}^+$ -Influxrate für kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen: Kontrolle 3,9 nMole/mg Protein x min.; 10^{-3}M g-Strophanthin 10,6 nMole/mg Protein x min.. Die Wirkung von Vanadat

Abb. 26

Kinetiken der ^{22}Na -Aufnahme in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur. Einfluß von g-Strophanthin



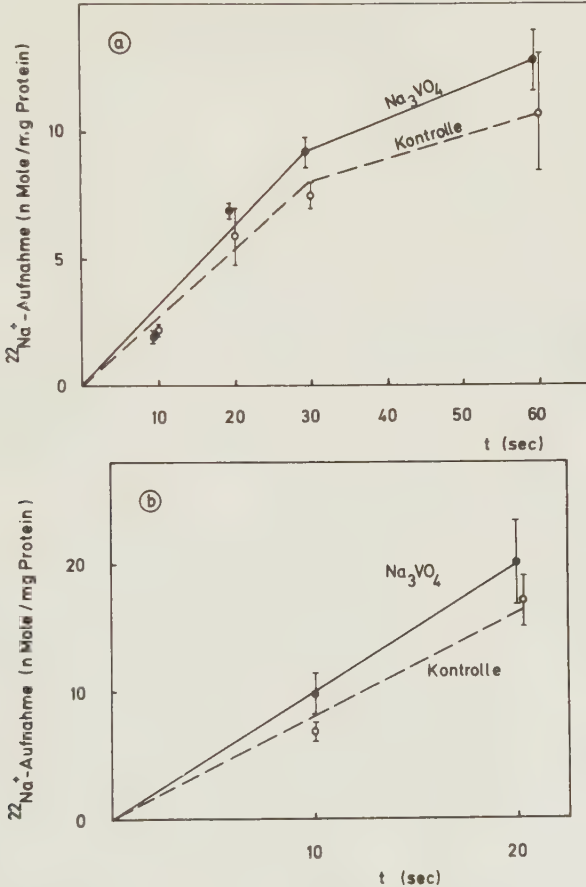
Vorinkubation der Zellen für 15 min. in HeS bzw. g-Strophanthin (10^{-3}M); Temp. = 37°C . Dann Zugabe von $6,20 \times 10^6$ cpm ($^{22}\text{Na}^{+}$)/Flasche für die jeweilige Einstromzeit. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. ($n=3$) angegeben, nachdem vorher die Nullwerte (siehe 2.4) abgezogen wurden (Kontrolle: $1,7 \pm 0,6$ nMole/mg Protein $\times$ min.; g-Strophanthin: $5,1 \pm 0,9$ nMole/mg Protein $\times$ min.). Zellprotein-Gehalt: 1,46 mg Protein/Flasche.

(10^{-3}M bzw. $3 \times 10^{-4}\text{M}$) auf den $^{22}\text{Na}^{+}$ -Einstrom in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen demonstriert die Abb. 27 - a in Abwesenheit, b in Gegenwart von g-Strophanthin. In beiden Fällen beobachtet man in Anwesenheit von Na_3VO_4 eine reproduzierbare, geringe Steigerung der $^{22}\text{Na}^{+}$ -Aufnahmerate um etwa 20 %. Für menschliche Girardi-Zellen, die in $3 \times 10^{-4}\text{M}$ Na_3VO_4 inkubiert wurden, kann ebenfalls eine Erhöhung (5 - 30 %) des $^{22}\text{Na}^{+}$ -Influxes demonstriert werden (Experiment nicht gezeigt).

Kultivierte Herzmuskelzellen besitzen zwei verschiedene Kanäle für die Aufnahme von Na^{+} -Ionen: Der "schnelle" Kanal kann durch Tetrodotoxin, ein Gift des japanischen Pufferfisches,

Abb. 27

Kinetiken der $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen in Abwesenheit (a) und Anwesenheit (b) von g-Strophanthin. Einfluß von Na_3VO_4



Vorinkubation der Zellen für 15 min. (a) bzw. 45 min. (b) in HeS (a) oder g-Strophanthin (10^{-5}M) (b), ohne bzw. in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-3}M (a) bzw. $3 \times 10^{-4}\text{M}$ (b)); Temp. = 37°C . Dann Zugabe von $9,55 \times 10^6$ cpm (a) bzw. $7,21 \times 10^6$ cpm (b) $^{22}\text{Na}^+$ /Flasche für die jeweilige Einstromzeit. Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (n=3) angegeben, nachdem vorher die Nullwerte (siehe 2.4) abgezogen wurden:

a): Kontrolle: $3,1 \pm 1,5$ nMole/mg Protein; Na_3VO_4 : $2,6 \pm 1,1$ nMole/mg Protein

b): Kontrolle: $5,4 \pm 0,8$ nMole/mg Protein; Na_3VO_4 : $7,5 \pm 1,2$ nMole/mg Protein

Zellprotein-Gehalte: 2,25 mg (a) bzw. 1,28 mg Protein/Flasche (b)

Tab. 8

Einfluß von D 600 und Tetrodotoxin auf die Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen

D 600/ITX-Konzentration (M)	$(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate (nMole/mg Protein x min.) in Gegenwart von			
	D 600		Tetrodotoxin (ITX)	
	Kontrolle	Na_3VO_4	Kontrolle	Na_3VO_4
-	12,9 ± 0,4	19,4 ± 1,5	12,6 ± 1,0	14,4 ± 0,6
10^{-7}	9,2 ± 0,3	13,0 ± 0,5	12,4 ± 0,9	15,9 ± 0,6
10^{-5}	9,5 ± 0,2	12,5 ± 0,9	11,7 ± 0,3	14,0 ± 0,9
10^{-4}			11,7 ± 0,9	14,1 ± 0,1

(Na_3VO_4) = 10^{-4}M ; alle Werte als Mittelwerte ± S.D. (n=3) angegeben.

Experiment mit D 600: Eine Stammlösung von D 600 wurde durch Lösen in Äthanol hergestellt und gleich in HeS weiterverdünnt. Bei der Kontrollmessung ohne D 600 wurde der Inkubationslösung (HeS) eine entsprechende Menge an Äthanol zugegeben. Vorinkubation der Zellen für 60 min. in HeS bzw. der jeweiligen D 600-Konzentration, entweder ohne oder in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-4}M); Temp. = 37°C . Danach Bestimmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate, dabei wurden $1,06 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 1,72 mg Protein/Flasche.

Auszählung der Kontraktionsfrequenz nach 55 min. Vorinkubation: Kontrolle (HeS alleine, also ohne D 600 und Na_3VO_4): $67 \pm 2/\text{min.}$; in Gegenwart von Na_3VO_4 : $72 \pm 2/\text{min.}$ (Mittelwerte ± S.E.M.; n=5). Bereits bei 10^{-7}M D 600 - in Abwesenheit von Na_3VO_4 - beobachtet man ein Sistieren der Kontraktionstätigkeit. In Gegenwart von Na_3VO_4 und 10^{-7}M D 600 zeigen nur einige wenige Zellen Kontraktionen (0 - 25/min.), während bei höheren D 600-Konzentrationen überhaupt ein Stop der Kontraktionstätigkeit erfolgt.

Experiment mit Tetrodotoxin (ITX): Vorinkubation der Zellen für 150 min. in HeS bzw. der jeweiligen ITX-Konzentration, entweder ohne oder in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-4}M); Temp. = 37°C . Danach Bestimmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate, dabei wurden $1,41 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 0,99 mg Protein/Flasche.

Auszählung der Kontraktionsfrequenz nach 145 min. Vorinkubation: Kontrolle (HeS alleine, also ohne ITX und Na_3VO_4): $42 \pm 1/\text{min.}$, in Gegenwart von Na_3VO_4 - ohne ITX: $50 \pm 2/\text{min.}$. ITX (10^{-4}M) ohne Na_3VO_4 : $32 \pm 2/\text{min.}$; ITX (10^{-4}M) in Gegenwart von Na_3VO_4 : $37 \pm 2/\text{min.}$ (Mittelwerte ± S.E.M., n=5).

blockiert werden; die Einschleusung von Na^+ -Ionen über den "langsamen" Kanal kann durch Gabe von D 600 unterbunden werden (Überblick bei (55)).

Um zu sehen, ob Vanadat möglicherweise die Eigenschaften einer dieser Na^+ -Kanäle verändert, soll im folgenden die Vanadat-induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in Gegenwart

von D 600 bzw. Tetrodotoxin bei kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen untersucht werden (Tab. 8). Diese indirekte Messung mit dem Tracer $^{86}\text{Rb}^+$ ist experimentell weniger aufwendig als die direkte Bestimmung der $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme. Sie ist deshalb zulässig, weil bei einer Beeinflussung der Na^+ -Aufnahme durch Vanadat über eine Veränderung des intrazellulären Na^+ -Spiegels eine Modifizierung der Pumpaktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase erfolgen würde.

Wie aus der Legende der Tab. 8 hervorgeht, sinkt die Kontraktionsfrequenz der untersuchten Ratten-Herzmuskelzellen mit steigender Konzentration an D 600, bei 10^{-7}M D 600 beobachtet man ein Sistieren der Kontraktionstätigkeit. Aufgrund der bereits geschilderten Abhängigkeit der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Influxrate von der Schlagfrequenz (Abb. 24), nimmt der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Einstrom in die Zelle ab. Die Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-4}M) wird jedoch bei keiner der getesteten D 600-Konzentrationen aufgehoben (Tab. 8).

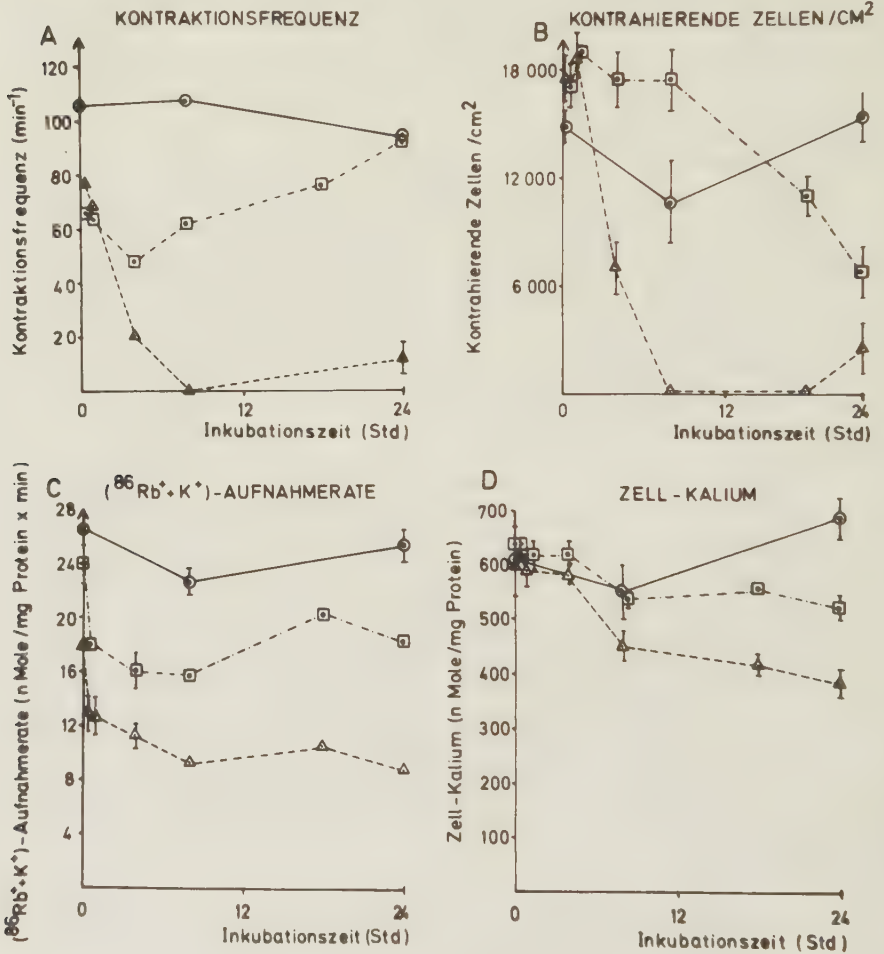
Fosset und Mitarbeiter (55) konnten zeigen, daß der Na^+ -Einstrom in kontrahierende Hühner-Herzmuskelzellen nahezu ausschließlich über "langsame" Na^+ -Kanäle abläuft, während die "schnellen" Na^+ -Kanäle zwar latent vorhanden sind, am Na^+ -Ionenfluß aber erst nach Stimulation durch das Ceveratrum-Alkaloid Veratridin beteiligt sind. Durch Blockierung der "schnellen" Na^+ -Kanäle mit Tetrodotoxin werden die Kontraktionsfrequenz und die $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen nur geringfügig beeinflußt, wie Tab. 8 demonstriert. Die Vanadat-induzierte Stimulierung des $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Einstroms in die Zelle ist selbst bei hoher Tetrodotoxin-Konzentration vorhanden (Tab. 8).

4.3.4 Langzeit-Wirkungen von Na_3VO_4 auf Kontraktilität, $(^{86}\text{Rb}^+)$ -Aufnahme und zellulären K^+ -Gehalt in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen

An kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur wurden die Langzeit-Wirkungen von Vanadat hinsichtlich der Parameter Kontraktilität, $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme und intrazellulärer K^+ -Gehalt studiert (Abb. 28). Dazu wurde das Zellmaterial bis zu 24 Stunden lang unter verschiedenen Bedingungen inkubiert:

Abb. 28

Langzeit-Wirkungen von Na_2VO_4 auf Kontraktionsfrequenz, Automatieneigung, $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate und zellulären K^+ -Gehalt in kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur



Die Zellen wurden für die unten angegebene Zeit inkubiert in komplettem Züchtungsmedium, ergänzt mit 10 % Pferdeserum und 10 % fetalem Kälberserum (○), Hepes-gepufferter Salzlösung (HeS) (△) bzw. HeS, ergänzt mit Na_2VO_4 (Endkonzentration = 10^{-4}M) (□).

Die Werte sind als Mittelwerte $\pm$ S.E.M. (für Kontraktionsfrequenz und Zahl der kontrahierenden Zellen/ cm^2 , $n=8$) bzw. als Mittelwerte $\pm$ S.D. (für $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate und zellulären K^+ -Gehalt, $n=3$) angegeben; die Standardabweichungen liegen innerhalb der verwendeten Symbole, wenn keine Begrenzungen

eingezeichnet sind. Der zelluläre K^+ -Gehalt wurde durch Flammenphotometrie bestimmt; $1,39 \times 10^6$ cpm $^{86}Rb^+$ /Flasche eingesetzt; Zellprotein-Gehalt: 0,70 mg Protein/Flasche.

Kontraktionsfrequenz, ($^{86}Rb^++K^+$)-Aufnahmerate und zellulärer K^+ -Gehalt kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen, inkubiert in komplettem Züchtungsmedium + 10 % Pferdeserum + 10 % fetalem Kälberserum. Die Werte in Gegenwart von $10^{-4}M Na_3VO_4$ sind jeweils in Klammern angegeben:

Vorinkubationszeit 0 Std.: 106 ± 1 /min.; $26,5 \pm 0,7$ ($27,6 \pm 1,4$) nMole/mg Protein x min.; 609 ± 63 (605 ± 40) nMole/mg Protein.

Vorinkubationszeit 8 Std.: 107 ± 2 (0)/min.; $22,7 \pm 1,0$ ($18,6 \pm 0,5$) nMole/mg Protein x min.; 548 ± 47 (602 ± 18) nMole/mg Protein.

Vorinkubationszeit 24 Std.: 94 ± 1 (0)/min.; $25,3 \pm 1,1$ ($19,1 \pm 0,4$) nMole/mg Protein x min.; 691 ± 35 (557 ± 8) nMole/mg Protein.

1. Inkubation in CMRL-Züchtungsmedium, ergänzt mit 10 % fetalem Kälberserum und 10 % Pferdeserum (siehe 2.7).
2. Inkubation in HeS (siehe 2.7), mit bzw. ohne Na_3VO_4 ($10^{-4}M$).

Kontraktionsfrequenz und Zahl der kontrahierenden Zellen/cm² dienten als Maß für die Kontraktilität. Durch ($^{86}Rb^++K^+$)-Influx-Messungen wurden die K^+ -Aufnahmeraten bestimmt, während man die intrazellulären K^+ -Gehalte über die Flammenphotometrie erhielt. Die untersuchten Parameter blieben in Gegenwart des kompletten Züchtungsmediums über 24 Stunden in etwa konstant (Abb.28). Inkubation derselben Zellen in gepufferter Salzlösung führte innerhalb des gleichen Zeitraums jedoch zu einer massiven Abnahme von Kontraktionsfrequenz und Automatieneigung (gemessen als Zahl der kontrahierenden Zellen/cm²). Gleichzeitig sank die ($^{86}Rb^++K^+$)-Aufnahmerate zeitabhängig bis auf etwa 50 % des Ausgangswertes und der intrazelluläre K^+ -Gehalt auf 64 % der Kontrolle ab. Sowohl die Abnahme von Schlagfrequenz und Automatieneigung als auch der reduzierte ($^{86}Rb^++K^+$)-Influx konnten - zumindest teilweise - durch Gabe von Na_3VO_4 ($10^{-4}M$) zur gepufferter Salzlösung verhindert werden (Abb. 28). In ähnlichen Experimenten war die Abnahme von Kontraktionsfrequenz, Automatieneigung, ($^{86}Rb^++K^+$)-Aufnahme und intrazellulärem K^+ -Gehalt nicht so deutlich ausgeprägt wie im oben dargestellten Experiment. Aber in jedem Fall zeigte sich für die untersuchten Parameter in Gegenwart von Vanadat eine Annäherung der reduzierten Werte an die entsprechenden Kontrollen in serumhaltigem Züchtungsmedium. Weiterhin

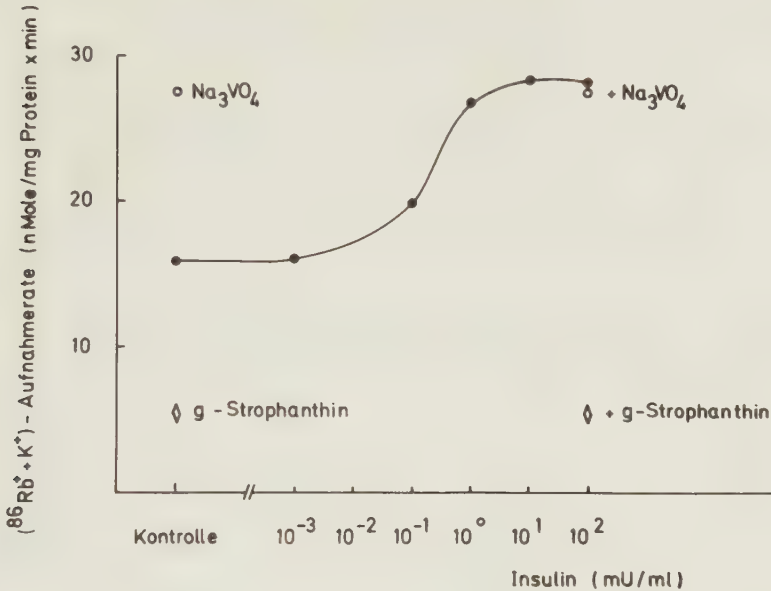
entwickeln kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen mit längerer Inkubationsdauer in gepufferter Salzlösung einen zunehmenden Prozentsatz an Arrhythmien, der sich jedoch in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-4}M) deutlich verringert (Experimente nicht gezeigt). Der stimulierende Effekt von Vanadat auf die verschiedenen untersuchten Parameter wird nur dann beobachtet, wenn die kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen für längere Zeit (bis zu 24 Stunden) in Hepes-gepufferter Salzlösung inkubiert werden. In komplettem Züchtungsmedium, ergänzt mit Pferde- und fetalem Kälber-Serum, kommt es in Gegenwart von Na_3VO_4 weder zu einer Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate, noch zu einer wesentlichen Veränderung der intrazellulären K^+ -Gehalte. Bei Vanadat-Konzentrationen $\geq 10^{-4}\text{M}$ zeigt sich sogar innerhalb von Minuten bis Stunden - zumindest bei einem Teil der Experimente (siehe auch Legende zu Abb. 28) - ein konzentrationsabhängiger Stop der Automatie der untersuchten Herzmuskelzellen.

4.4 VERGLEICH DER WIRKUNGEN VON INSULIN UND Na_3VO_4 AUF ($^{86}\text{Rb}^+$)-EINSTROM, ZELLULÄREN K^+ -GEHALT UND 2-deoxy-D- (^3H)-GLUKOSE-AUFNAHME IN KULTIVIERTEN HERZZELLEN

Um die stimulierende Wirkung von Vanadat auf die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate (Abb. 20 und 21) und den zellulären K^+ -Gehalt (Tab. 6, Abb. 25) kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen zu erklären, erfolgte ein Vergleich der Effekte mit Insulin, von dem ebenfalls eine Steigerung der K^+ -Aufnahme mit konsekutiver Erhöhung des intrazellulären K^+ -Spiegels in Herzmuskelgewebe beschrieben wurde (Überblick bei (30, 184)). Dubyak und Kleinzeller (33) berichten von einer insulinähnlichen Wirkung des Na_3VO_4 auf den Hexose-Transport in Ratten-Adipozyten. Die folgenden Experimente sollen klären, ob Vanadat nicht nur im Hinblick auf die 2-deoxy-D- (^3H)-Glukose-Aufnahme, sondern auch in bezug auf den aktiven K^+ -Transport sowie den intrazellulären K^+ -Gehalt kultivierter Herzzellen eine insulinähnliche Wirkung entfaltet.

Abb. 29

Konzentrationsabhängige Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur durch Insulin. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin



Vorinkubation der Zellen für 240 min. in HeS bzw. bei der jeweiligen Insulin-Aktivität. Daneben zusätzliche Vorinkubation einiger Werte in g-Strophanthin (10^{-3}M) bzw. Na_3VO_4 ($3 \times 10^{-4}\text{M}$), alleine oder in Kombination mit 10^2 mU/ml Insulin. Danach Bestimmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate, dabei $1,02 \times 10^6$ cpm $^{86}\text{Rb}^+$ /Flasche eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 0,52 mg Protein/Flasche.

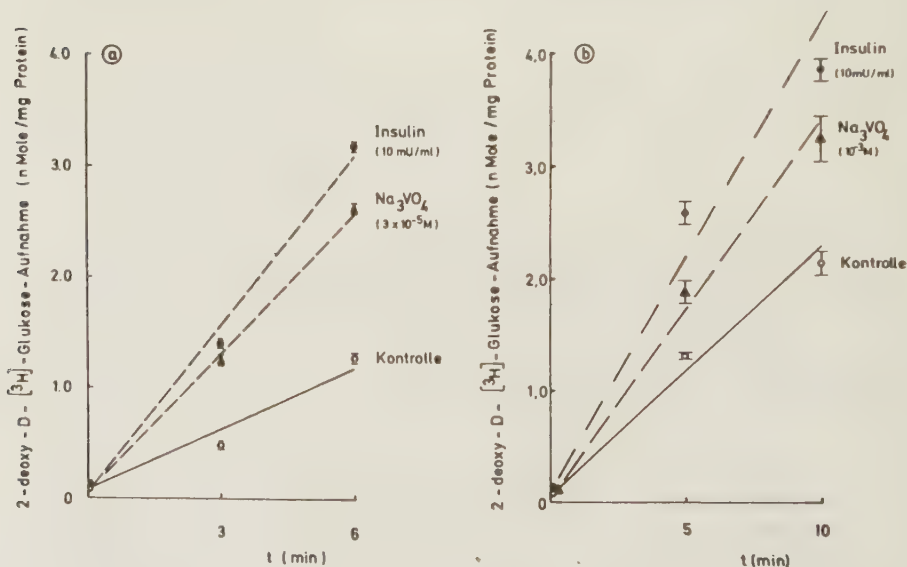
Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

In Abb. 29 ist die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen in Abhängigkeit von steigenden Rinderinsulin-Aktivitäten aufgetragen: Insulin erhöht konzentrationsabhängig die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate ($\text{EC}_{50} = 0,1 - 1,0$ mU/ml, maximale Stimulation um 80 %). Im identischen Experiment beobachtet man eine ähnliche Zunahme des ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstroms in Gegenwart von Na_3VO_4 (10^{-3}M) anstelle von Insulin (Abb. 29). Gleichzeitige Gabe von Insulin und Vanadat hoher Aktivität (100 mU/ml) bzw. Dosis (10^{-3}M) führt zu keiner weiteren Er-

höhung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate über den bereits bekannten Maximalwert hinaus (Abb. 29). Der Insulin-Effekt ist hier wie der Na_3VO_4 -Effekt g-Strophanthin-empfindlich, da beide durch hohe Herzglykosid-Konzentrationen gehemmt werden (vgl. Tab. 7 und Abb. 23). Korrelierend mit der gesteigerten ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme ist bei kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen der zelluläre Gehalt an K^+ -Ionen in Gegenwart von Insulin erhöht (Tab. 9). Diese Insulin-induzierte Anhebung des intrazellulären K^+ -Spiegels wird durch hohe g-Strophanthin-Konzentrationen verhindert (Experiment nicht gezeigt), wie dies in ähnlicher Weise bereits für Na_3VO_4 beschrieben wurde.

Abb. 30

Kinetiken der 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen (a) und Girardi-Herzzellen (b). Einfluß von Na_3VO_4 und Insulin



Vorinkubation der Zellen für 240 min. in HeS, Na_3VO_4 ($3 \times 10^{-5}\text{M}$ (a), 10^{-3}M (b)) bzw. Insulin (10 mU/ml). Dann Bestimmung der Hexose-Aufnahme, dabei wurden $0,94 \times 10^6$ cpm (a) bzw. $1,03 \times 10^6$ cpm 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose/Flasche (b) eingesetzt. Zellprotein-Gehalt: 0,52 mg (a) bzw. 0,82 mg Protein/Flasche (b). Die Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ S.D. (n=3) angegeben. Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe im Text bzw. unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Tab. 9

Vergleich der Wirkungen von Insulin und Na_3VO_4 auf ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstrom, 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme und intrazellulären K^+ -Gehalt bei verschiedenen kultivierten Herzzelltypen

Zelltyp	($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate (nMole/mg Protein x min.)		
	Kontrolle	Insulin	Na_3VO_4
I	15,8 $\pm$ 0,4	28,4 $\pm$ 0,3	27,6 $\pm$ 1,3
II	10,2 $\pm$ 0,8	12,6 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 1,4
III	14,3 $\pm$ 0,2	17,8 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 0,1
IV	14,9 $\pm$ 0,3	11,9 $\pm$ 1,4	9,7 $\pm$ 1,5
V	6,5 $\pm$ 0,1	8,6 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,1
2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahmerate (nMole/mg Protein x min.)			
I	0,21 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,02
II	0,21 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02
III	0,23 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,02
V	0,19 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02
Zellulärer K^+ -Gehalt (nMole/mg Protein)			
I	588 $\pm$ 16	621 $\pm$ 20	620 $\pm$ 15
II	715 $\pm$ 66	863 $\pm$ 39	820 $\pm$ 47
IV	617 $\pm$ 28	625 $\pm$ 39	500 $\pm$ 39
V	491 $\pm$ 39	565 $\pm$ 39	586 $\pm$ 31
I	Rattenherz-Muskelzellen		
II	Menschliche Girardi-Herzzellen		
III	Meerschweinchenherz-Nichtmuskelzellen		
IV	Hühnerherz-Nichtmuskelzellen		
V	Rattenherz-Nichtmuskelzellen		

Der intrazelluläre K^+ -Gehalt wurde durch Flammenphotometrie bestimmt. (Rinderinsulin) = 10 mU/ml (I, II, III, V) bzw. 100 mU/ml (IV); (Na_3VO_4) für die Messung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate und des Zell-Kaliums: $3 \times 10^{-4}\text{M}$ (I, II, III) bzw. 10^{-3}M (IV, V). (Na_3VO_4) für die Messung der 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme: $3 \times 10^{-5}\text{M}$ (I, III), 10^{-4}M (V) bzw. 10^{-3}M (II). Bei I, III und V führen höhere Na_3VO_4 -Konzentrationen als die eingesetzten zu einer Verminderung der 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme. (K^+) der Inkubationslösung = 5,4 mM; (2-deoxy-D-(^3H)-Glukose) = 0,1 mM.

Vorinkubationszeit, ($^{86}\text{Rb}^+$)- bzw. 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Radioaktivität und Zellprotein-Gehalt/Flasche:

I	240 min.;	$1,02 \times 10^6$	cpm;	$0,94 \times 10^6$	cpm;	0,52 mg
II	200 min.;	$2,69 \times 10^6$	cpm;	$1,03 \times 10^6$	cpm;	0,80 mg
III	240 min.;	$1,97 \times 10^6$	cpm;	$0,92 \times 10^6$	cpm;	0,65 mg
IV	240 min.;	$2,38 \times 10^6$	cpm ($^{86}\text{Rb}^+$)			0,26 mg
V	240 min.;	$1,41 \times 10^6$	cpm;	$0,94 \times 10^6$	cpm;	1,30 mg

Alle Meßwerte sind als Mittelwerte $\pm$ S.D. (n=3 - 6) angegeben. Nach weiteren experimentellen Einzelheiten siehe unter MATERIALIEN UND METHODEN.

Nachdem Vanadat insulinartig die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate und das Zell-Kalium kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen sowie menschlicher Girardi-Herzzellen zu beeinflussen vermag, soll am gleichen Zellmaterial geprüft werden, ob Na_3VO_4 und Insulin auch synergistisch bezüglich der zellulären Glukose-Aufnahme wirken. Letzteres konnte bereits für isolierte Ratten-Adipozyten gezeigt werden (33). Wie die Kinetiken der Abb. 30 veranschaulichen, kann bei beiden Zelltypen die Aufnahme von 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose sowohl durch Insulin (10 mU/ml) als auch durch Na_3VO_4 ($3 \times 10^{-5}\text{M}$ (a) bzw. 10^{-3}M (b)) signifikant stimuliert werden, während sich nach Gabe von g-Strophanthin keine Änderung der untersuchten Aufnahmerate gegenüber dem Kontrollwert einstellt (Experiment nicht gezeigt).

Ähnliche Untersuchungen über die Wirkung von Na_3VO_4 bzw. Insulin auf die Parameter ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstrom, intrazelluläre K^+ -Konzentration und Hexose-Aufnahmerate wurden auch noch mit mehreren anderen Herzzelllinien verschiedener Spezies durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefaßt:

Die Zellen, deren ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influx und zellulärer K^+ -Gehalt in Gegenwart von Vanadat erhöht sind (fibroblastoide Ratten-Herzzellen und menschliche Girardi-Zellen), reagieren auf Insulin- wie auf Na_3VO_4 -Gabe gleichsinnig: ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)- und 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahmerate werden stimuliert, der intrazelluläre K^+ -Spiegel steigt an. Im Gegensatz dazu beobachtet man bei Zellarten, deren ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstromrate in Gegenwart von Na_3VO_4 inhibiert wird, unterschiedliche Wirkungen von Insulin bzw. Vanadat hinsichtlich der untersuchten Parameter:

Fibroblastoide Zellen aus Meerschweinchenherzen reagieren auf Insulin-Gabe mit einer Steigerung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Influxrate, während bei Inkubation der Zellen in Na_3VO_4 eine Hemmung eintritt. Die Stimulierung der 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme wird wohl durch Insulin induziert, bleibt jedoch in Gegenwart von Vanadat aus. In fibroblastoiden Zellen, die aus den Herzen von Hühnerembryonen isoliert wurden, vermag Rinderinsulin die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme nicht zu steigern; das Zell-Kalium zeigt sich gegenüber dem Kontrollwert unverändert. Dagegen inhibiert Na_3VO_4 den ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Einstrom und senkt gleichzeitig die intrazelluläre K^+ -Konzentration dieser Zellen (Tab. 9).

5. DISKUSSION

Bereits 1876 berichteten Gamgee und Larmuth über Vanadium, "the metal acted in a manner practically analogous to that of digitalis" (zitiert in (89)). Aber erst 100 Jahre später sollte dieser Gedanke neu aufgegriffen werden: Als Vanadium-Verbindungen analog den Herzglykosiden zu einer Hemmung der isolierten $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase führten (8, 19, 21, 124, 132) und sich am Katzenpapillarmuskel positiv inotrop zeigten (45, 73, 145), glaubte man, mit dem Spurenelement Vanadium einen endogenen Regulator der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase, dem biochemischen Äquivalent der Na^+ -Pumpe (65, 69, 158), gefunden zu haben (17, 19, 21, 48, 154).

5.1 AUFNAHME UND ANREICHERUNG VON Na_3VO_4 IN KULTIVIERTEN RATTEN-HERZMUSKELZELLEN

Für die Glykosid-induzierte Auslösung der positiv inotropen Wirkung am Herzmuskel wird von der Mehrzahl der Autoren eine partielle Inhibierung der myokardialen $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase als Voraussetzung angenommen (1, 13). Während Herzglykoside spezifisch an eine dem Extrazellulärraum zugewandte Untereinheit dieses Enzyms binden (85, 128), wird für Na_3VO_4 eine Interaktion mit der cytoplasmatischen Seite des in die Zellmembran eingelagerten ATPase-Moleküls favorisiert (20, 22). Dies jedoch macht einen Transport von Vanadium-Ionen über die Zellmembran notwendig, bevor überhaupt irgendeine Wechselwirkung von Na_3VO_4 mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase stattfinden kann (vgl. (10, 20, 33)).

5.1.1 Charakterisierung der Na_3VO_4 -Aufnahme

Abb. 10 demonstriert die Aufnahme von Vanadat über die Zellmembran kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen; dabei wird die initiale lineare Komponente der Kinetik als Vanadat-Transport interpretiert (175). Dieser Prozeß erweist sich als sättigbar (Abb. 11) und arbeitet energieunabhängig (siehe 4.1.1). Die Befunde sind mit einer "erleichterten Diffusion" vereinbar, wenngleich bei dieser Art von Aufnahmemechanismus eigentlich

eine stärkere Temperaturabhängigkeit als die hier gefundene (Abb. 12) erwartet werden muß.

In menschlichen Erythrozyten erfolgt die Vanadat-Aufnahme über das Anionen-Austausch-System (20) (vgl. auch (10, 135)). Die Affinität dieses Aufnahmeprozesses für Vanadat ist relativ gering ($K_M \approx 40$ mM) und liegt dabei in derselben Größenordnung wie für Phosphat ($K_M \approx 80$ mM) (20). Im Gegensatz dazu beträgt die Michaelis-Konstante K_M für den Vanadat-Transport in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen etwa 70 μ M (siehe 4.1.1). Falls diese Na_3VO_4 -Aufnahme ebenfalls über den Anionen-Carrier erfolgen sollte, wäre dieser in myokardialen Rattenzellen 1.000fach affiner gegenüber Na_3VO_4 als in menschlichen Erythrozyten. Zugabe von Phosphat im Überschuß bewirkt - wie das Kompetitions-Experiment der Tab. 2 verdeutlicht - keine Verminderung der Aufnahme von radioaktiv markiertem Na_3VO_4 . Dies weist auf eine hohe Spezifität dieses Vanadat-Transportes im Vergleich mit Phosphat hin. Im Gegensatz dazu kompetitieren verschiedene getestete Vanadium-Verbindungen mit $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ um die Interaktion mit dem charakterisierten Aufnahme-System. Dies mag - zumindest teilweise - durch die äußerst komplexe Vanadium-Chemie erklärt werden, auf die in 5.1.2 noch detaillierter eingegangen werden soll.

Obwohl die gezeigten experimentellen Daten vereinbar sind mit der Existenz eines speziellen Aufnahmemechanismus für Vanadationen, gibt es bis heute keinen direkten Beweis dafür - diese Problematik wurde bereits im Kapitel 4 angedeutet -, daß Vanadat tatsächlich im Zellinneren erscheint und dabei ein spezielles Carriersystem beteiligt ist. Mit derselben Berechtigung könnte die initiale lineare Aufnahmephase als einfache Bindung von Na_3VO_4 an die extrazelluläre Zellmembranseite interpretiert werden. Weiterhin muß man ebenso ein passives Eindringen von Vanadium-Ionen durch unspezifische Poren der Zellmembran mit konsekutiver Bindung an intrazelluläre Strukturen diskutieren. Diese beiden Möglichkeiten erscheinen jedoch aus verschiedenen Gründen als unwahrscheinlich:

1. Waschen des Zellrasens mit Noradrenalin vermag das zellulär gebundene $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ nicht zu entfernen. Somit ist es un-

wahrscheinlich, daß Vanadat mit Lipiden oder Proteinen auf der Zellmembran-Außenseite eine Komplexverbindung eingeht (vgl. (20)).

2. Die Na_3VO_4 -Aufnahmekurven stellen nicht die Kinetik 2. Grades dar (Experiment nicht gezeigt), wie man sie erwarten müßte, wenn der Aufnahmemechanismus nur eine einfache Bindung von Vanadat an eine Bindungsstelle nach folgendem Schema wäre: Vanadat + Bindungsstelle $\rightleftharpoons$ Vanadat-Bindungsstelle - Komplex.
3. Die Linearität der Vanadat-Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen geht verloren, sobald die intrazelluläre Vanadat-Konzentration der extrazellulären gleicht. Das ist vereinbar mit einem energieunabhängigen Carrier-vermittelten Transport. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß bei Erythrozyten-Experimenten die Abnahme des Tracers ^{48}V in der Inkubationslösung durch einen biphasischen Prozeß gekennzeichnet war: Die initiale schnelle Phase war beendet, als intra- und extrazellulär gleiche ^{48}V -Konzentrationen erreicht waren (20, 112).
4. Die Glykokalyx der Zellmembran enthält hauptsächlich negativ geladene Moleküle (84), die kaum eine Bindung mit den gleichfalls negativ geladenen Vanadium-Ionen eingehen dürften. Wenn jedoch Vanadat tatsächlich an die Zellmembran gebunden wird, müssen diese Bindungsstellen als hochaffin für vanadiumhaltige Verbindungen angesehen werden (siehe Tab. 2).

5.1.2 Charakterisierung der Na_3VO_4 -Anreicherung

Die Zellmembran kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen ist mit etwa $10^5 - 10^6$ ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Molekülen pro Zelle besetzt, wenn man eine Stöchiometrie von einem gebundenen Molekül g-Strophanthin pro Molekül ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase zugrunde legt (60, 117). Die Anzahl maximal gebundener Vanadium-Moleküle pro kultivierte Ratten-Herzmuskelzelle beträgt jedoch etwa $(3 - 27) \times 10^9$ (Tab. 4), das sind 2.000 - 13.000mal so viele Bindungsstellen wie dieselbe Zelle ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Moleküle besitzt. Um diese Befunde in ihrer Aussagekraft besser verstehen zu können, soll zunächst ein kurzer Abriß der reichlich komplexen

Vanadium-Chemie gegeben werden:

Na_3VO_4 , die Vanadium-Verbindung, die in den meisten Experimenten verwendet wurde, liegt bei $\text{pH} = 7,25$ und einer Konzentration $\leq 10^{-4}\text{M}$ überwiegend als H_2VO_4^- ("Meta"-Vanadat) vor. Deprotonierung ($\text{pK} \approx 8,2$) führt zu HVO_4^{2-} ("Pyro"-Vanadat), nochmaliger H^+ -Entzug ($\text{pK} \approx 13,1$) zum VO_4^{3-} ("Ortho"-Vanadat). In saurem Milieu findet man dagegen HVO_3 bzw. VO_2^- ($\text{pK} \approx 3,4$) (130, 139). Bei höheren Konzentrationen bilden sich aus den Vanadium-Monomeren Poly-Vanadate, wie $\text{V}_3\text{O}_9^{3-}$ und $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$; welche dieser cyclischen Formen vorherrscht, gilt als umstritten (130). Mit der Bildung von Dekavanadat ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) - leicht erkennbar am charakteristischen gelborangen Farbumschlag - muß bei Überschreiten der 10 mM-Konzentrationsgrenze gerechnet werden (130), auch wenn dies mehrere Autoren nur für saures Milieu ($\text{pH} < 5$) angeben (113, 119).

Als Frage von zentraler Bedeutung hat sich in der aktuellen Vanadium-Forschung der Oxidationszustand des V-Moleküls herauskristallisiert. Grundsätzlich kann Vanadium in biologischen Systemen in +III-, +IV- und +V-wertiger Form vorkommen (113).

V^{III} ist jedoch nur in stark saurem ($\text{pH} < 2$) Milieu unter O_2 -Ausschluß stabil; man findet es z. B. hochkonzentriert in den Blutzellen der Tunikaten (113, 140). In wässriger Lösung bei neutralem pH wird V^{III} aufgrund des gelösten Sauerstoffs über V^{IV} sofort zu V^{V} oxidiert (68, 139).

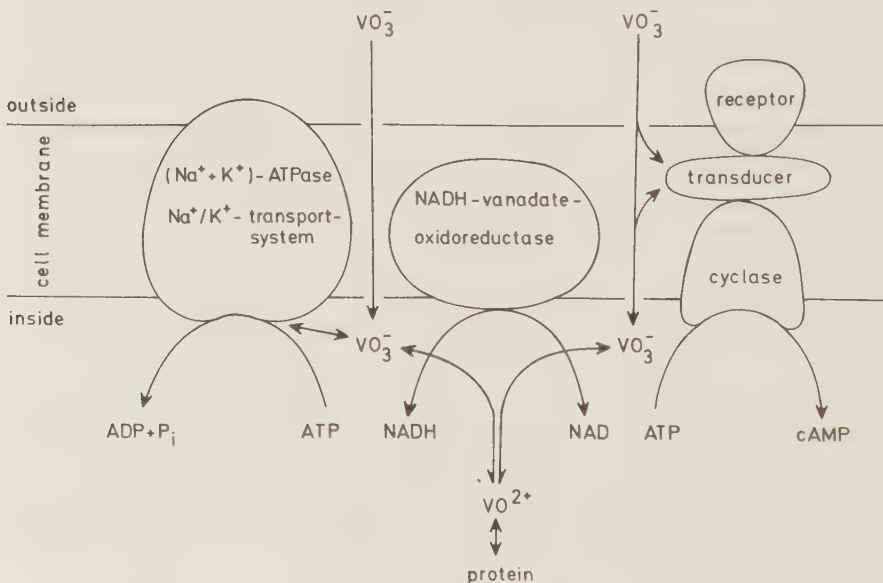
Man kann also davon ausgehen, daß das häufig verwendete Na_3VO_4 und wahrscheinlich auch die übrigen im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Vanadium-Verbindungen in der Inkubationslösung als +V-wertiges Vanadat in Erscheinung treten. Dies erklärt, warum alle getesteten Vanadium-Verbindungen (a) die Aufnahme von Na_3VO_4 kompetitiv inhibieren (Tab. 2) und (b) sich ähnlich wie Na_3VO_4 verhalten bezüglich der Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme, des positiv chronotropen Effektes und der Erhöhung der Automatieneigung in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen (Abb. 18).

Chelierende Verbindungen, wie diverse Katecholamine oder Catechole, EDTA, EGTA, 2,3-DPG oder ATP, gehen mit Vanadium eine Komplexverbindung ein und bewirken dabei gleichzeitig

eine Reduzierung des Vanadats zur +IV-wertigen Vanadylform (VO^{2+}) (88, 105, 112, 182). In Gegenwart milder Reduktionsmittel, z. B. Ascorbinsäure (68, 88, 98), beobachtet man ebenfalls die Überführung von Vanadat in die +IV-wertige Konfiguration (119).

Physiologisch wesentlich bedeutsamer sind jedoch cytoplasmatisch lokalisierte Redoxsysteme wie die $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ - bzw. $\text{NADP}^+/\text{NADPH}_2$ -Dehydrogenasen oder die Glutathion-Reductase. In diesem Zusammenhang ist die Entdeckung eines enzymatisch katalysierten Prozesses interessant, der im Myokardgewebe bzw. menschlichen Erythrozyten unter NADH_2 -Verbrauch Vanadat in Vanadyl überführt (46); für diese NADH -Vanadat-Oxidoreduktase wird eine Lokalisation auf der Innenseite der Zellmembran angenommen (49) (vgl. Abb. 31).

Abb. 31 (aus (49) mit freundlicher Genehmigung der Autoren).
Scheme of the fate of vanadate at the cardiac cell membrane.



Vanadate affects cell-membrane-bound enzymes. It is transported into the cell, converted to vanadyl(IV) and bound to cell proteins. The reaction vanadate - vanadyl is reversible.

Die Arbeitsgruppe um Crane (133) berichtet, daß in Zell- bzw. Endomembran-Präparationen aus Leberparenchym bzw. Erythrozyten die Oxidation von NADH durch Vanadium ($K_M = 1,3 \text{ mM}$) auf das 10 - 20fache stimuliert wird. Dabei fungiert Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor. Die genaue chemische Konfiguration der verwendeten Vanadium-Verbindung wird zwar in den Experimenten nicht geklärt, doch zeigt das Absorptionsspektrum für Vanadat während der unter NADH-Verbrauch ablaufenden Reaktion keinerlei Veränderung (133), d. h. Vanadat muß hier - im Unterschied zu dem von Erdmann charakterisierten Prozeß (49) - nicht als Substrat, sondern als Katalysator angesehen werden. So diskutieren die Autoren für eine ebenfalls beschriebene, allerdings nicht-enzymatisch katalysierte Variante der Vanadium-stimulierten Oxidation von NADH für Vanadat eine Rolle als intermediärer Elektronen-Carrier (133).

Neben dem enzymatischen ist auch ein nicht-enzymatischer Ablauf der Reduktion von Vanadat in die V^{IV} -Konfiguration möglich; er wird z. B. in NADH- oder NADPH-haltigem Medium beobachtet (170). Gegenüber diesen beiden Reduktionsmitteln erachtet Macara (112) hauptsächlich das nicht-Enzym-gekoppelte Glutathion, das intrazellulär in millimolaren Konzentrationen vorkommt (68, 113), als verantwortlich für die intrazelluläre Überführung von Vanadat in Vanadyl. Interessanterweise kann diesem Reduktionsvorgang ($T_{1/2} \approx 130 \text{ min.}$) die zweite, langsamere Komponente der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme ($T_{1/2} \approx 160 \text{ min.}$) in menschliche Erythrozyten zugeordnet werden (112).

Ein Molekül ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase bindet ein bzw. zwei Moleküle Vanadat (20, 77). Obwohl die wirkliche Anzahl Vanadium-haltiger Moleküle pro Ratten-Herzmuskelzelle (Tab. 4) - diese Berechnung bezieht sich auf $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Monomere - durch Kondensationsreaktionen vermindert werden kann, übertrifft sie die Zahl von ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Molekülen pro Zelle etwa um den Faktor 10^4 . Der gebogene Kurvenverlauf der Auftragung nach Scatchard für intrazellulär gebundenes Vanadium (Abb. 13) könnte vereinbar sein mit negativer Kooperativität oder einer Vielzahl unterschiedlicher spezifischer Bindungsstellen (vgl. (150)). Sehr viel wahrscheinlicher ist aber, daß das meiste des großen Betrages an intrazellulärem Vanadium in unspezifischer Weise

im Zellinneren gebunden oder komplexiert vorliegt (vgl. (90)). So findet man in menschlichen Erythrozyten einen großen Teil des intrazellulären Vanadiums an Hämoglobin gebunden (22). Rote Blutkörperchen stellen einen sehr spezialisierten, zellkernlosen Zelltyp dar; man kann jedoch aus diesen Daten vermuten, daß auch in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen ein hoher Anteil intrazellulär akkumulierten Vanadyls unspezifisch an Moleküle mit hohem Molekulargewicht gebunden ist. Und doch müssen nur ca. 0,25 - 1 % der gesamten Bindungsstellen von Vanadium besetzt sein, um signifikant die Automatieneigung kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen zu steigern (Tab. 3 und Abb. 16). Die Maximaleffekte bezüglich Kontraktionsfrequenz und Bathmotropie sowie Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme sind erreicht, wenn 1/4 der maximalen Bindungskapazität der Myokardzellen mit Vanadyl abgesättigt sind (Tab. 3, Abb. 16 und 21) (175).

Ruft man sich in Erinnerung, daß bei Bindungsstudien mit (^3H)-g-Strophanthin an kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen sehr genau differenziert werden muß (117) zwischen spezifischen, d. h. ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Molekülen der Zellmembran, und unspezifischen Bindungsstellen, die schon bei g-Strophanthinkonzentration $\geq 10^{-6}\text{M}$ die spezifischen zahlenmäßig zu übertreffen beginnen, erscheint der Schluß durchaus gerechtfertigt, für kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen auch spezifische Vanadium-Bindungsstellen zu postulieren.

Möglicherweise ist die Besetzung solcher spezifischer Rezeptoren durch Vanadium als ursächlich für die geschilderten biologischen Effekte anzusehen. Aus Studien mit Membranpräparationen kennt man eine ganze Reihe von Enzymen (Überblick bei (113, 150)), für die eine Interaktion mit Vanadium auch in kultivierten Herzzellen diskutiert werden muß. Unser Interesse galt vor allem der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase, dem biochemischen Äquivalent der aktiven Na^+ -Pumpe (65, 69). Ob die in vitro beobachtete, Vanadat-induzierte Inhibierung dieses Enzyms (21, 68, 124) (Abb. 19) auch tatsächlich von physiologischer Bedeutung ist, wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.2 WIRKUNG VON Na_3VO_4 AUF IONENFLÜSSE UND INTRAZELLULÄRE ELEKTROLYTGEHALTE VERSCHIEDENER HERZZELLTYPEN

Betrachtet man die Kurvenverläufe in den Abb. 21 und 22, so stellt man fest, daß die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmeraten kultivierter Herzzellen verschiedener Spezies durch Vanadat entweder gehemmt oder stimuliert werden (177). Entsprechend diesen Na_3VO_4 -Wirkungen auf den aktiven K^+ -Transport stellt sich sekundär - zumindest in qualitativer Hinsicht - eine Modifizierung der zellulären K^+ -Gehalte ein (Tab. 6).

Über Unterschiede in Präparation und Kultivierung bei diversen Zelltypen wurde in MATERIALIEN UND METHODEN (2.1) berichtet. Es kann nie ganz ausgeschlossen werden, daß zelluläre Strukturen und Zellstoffwechsel durch Präparations- und Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden. Dies gilt insbesondere für Primärkulturen, in unserem Fall kultivierte Herzmuskelzellen. Solche Präparations- und Kultivierungs-"Artefakte" können jedoch kaum als ursächlich für die Heterogenität der Vanadat-Effekte in unseren Experimenten angesehen werden:

So wurden z. B. menschliche Girardi- und fibroblastoide Hühner- Herzzellen unter identischen Bedingungen kultiviert; die Wirkung von Na_3VO_4 auf die ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme zeigte sich jedoch nicht mehr uniform: In kultivierten Herzzellen von Meerschweinchen beobachtete man eine Inhibierung, in menschlichen Girardi-Zellen dagegen eine Stimulierung.

Welche Grundmechanismen liegen der beobachteten Heterogenität der Vanadat-Wirkung zugrunde? Diese Frage soll im folgenden erörtert werden:

5.2.1 Inhibierung der K^+ -Aufnahme

Die Hemmung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme fibroblastoider Herzzellen vom Huhn (Abb. 22 c) bzw. Meerschweinchen (Abb. 22 d) kann wie die Inhibierung des K^+ -aktivierten Na^+ -Effluxes am Tintenfisch-Axon (9) auf eine Hemmung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase in der intakten Zelle zurückgeführt werden. Dieser Befund korreliert mit der Vanadat-induzierten Inhibierung der isolierten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (21, 68). Die Übertragung von Ergebnissen aus der Ar-

beit mit Membranpräparationen auf die Situation im intakten Zell- bzw. Gewebe-Verband muß allerdings mit großer Vorsicht erfolgen, denn sie ist zumindest in quantitativer Hinsicht nicht zulässig, wie zwei Beispiele demonstrieren:

Am isolierten Enzym menschlicher Erythrozyten wird für Vanadat eine IC_{50} von 40 nM gemessen (20), die halbmaximale Hemmung des $^{86}Rb^{+}$ -Einstroms in "Ghosts" roter Blutkörperchen liegt jedoch um 3 Größenordnungen höher bei 40 μM (20). Die Arbeitsgruppe von Akera (2) berichtet, daß bei Experimenten am Meerschweinchen-Vorhof die isolierte $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase durch 2 μM V_2O_5 halbmaximal gehemmt wurde, bei derselben Vanadium-Konzentration am elektrisch gereizten Muskelpräparat jedoch keinerlei Inhibierung der g-Strophanthin-empfindlichen $^{86}Rb^{+}$ -Aufnahme eintrat. Erst bei 20 μM V_2O_5 beobachtete man eine Verminderung der Tracer-Anreicherung um 25 %, während die IC_{25} am isolierten Enzym um fast zwei Größenordnungen niedriger bei 0,5 μM Vanadumpentoxyd lag (2). Eine mögliche Ursache dieser Konzentrationsunterschiede wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Vergleicht man die Wirkungen von Vanadat und g-Strophanthin, so sieht man, daß der $(^{86}Rb^{+}+K^{+})$ -Influx sowohl in Meerschweinchen- wie in Hühnerherzfibroblasten durch beide Substanzen in etwa gleichem Ausmaß gehemmt wird (Tab. 6, Abb. 22). Gleichzeitig führt aber g-Strophanthin zu einer drastischen Verminderung des Zell-Kaliums (Tab. 6), während in Gegenwart von Na_3VO_4 eine wesentlich geringere Senkung des intrazellulären K^{+} -Spiegels beobachtet wird (Tab. 6).

Aufgrund dieser Unterschiede müssen neben der einfachen Hemmung der Na^{+} -Pumpe zusätzliche Mechanismen diskutiert werden, die in die Vanadat-induzierte Modifizierung des monovalenten Kationen-Flusses involviert sind (siehe 5.2.2).

5.2.2 Fehlende Inhibierung der K^{+} -Aufnahme

Ein Ausbleiben der Hemmung der $(^{86}Rb^{+}+K^{+})$ -Aufnahme in Gegenwart von Vanadat, wie es in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen (Tab. 6, Abb. 20 und 21), menschlichen Girardi-Herzellen (Abb. 22 b) und in einer kultivierten Nierenepithel-

zellinie (123) beobachtet wird, schließt die hemmende Wirkung von Na_3VO_4 auf die isolierte $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in Rattenmyokard- bzw. Nierenparenchym-Membranpräparationen (Abb. 19) (21, 68) nicht aus.

Sowohl dieses Phänomen wie die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Dissoziation der Na_3VO_4 -Wirkkonzentrationen in vivo und in vitro könnten Erklärung finden durch zusätzliche Mechanismen, die die Interaktion von Vanadat mit der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ beeinflussen:

1. Nur Vanadium in +V-wertiger Konfiguration gilt gegenüber dem +IV-wertigen Vanadyl als wirksamer Inhibitor der isolierten $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ (22, 68).
2. Eben dieses +V-wertige Vanadat kann enzymatisch oder nicht-enzymatisch zu +IV-wertigem Vanadium reduziert werden (siehe oben).
3. In vivo-Experimente mit Erythrozyten (22, 112), Leber- und Nierenparenchym (90, 141) sprechen indirekt dafür, daß dieser Reduktionsvorgang in der intakten Zelle stattfindet: Im Zellinneren findet man Vanadium nicht in der applizierten pentavalenten Form, sondern als +IV-wertiges Vanadyl; dabei wird eine Komplexierung von V^{IV} mit intrazellulären Proteinen oder kleineren Molekülen, z. B. ATP, diskutiert (22, 90, 112, 131).

Es ist daher anzunehmen, daß in den Zelltypen, in denen man eine Hemmung des aktiven K^+ -Transportes durch Vanadat (V) beobachtet, Vanadium enzymatisch und/oder nicht-enzymatisch zu unwirksamem +IV-wertigen Vanadyl reduziert wird. Dieser Reduktionsvorgang erklärt das Ausbleiben der Inhibierung weit besser als die Annahme, Vanadat könne nicht ins Innere dieser Zelltypen gelangen. Letzteres Argument wird durch experimentelle Befunde entkräftet, die zeigen, daß Vanadat in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen (Abb. 10), isolierte Ratten-Adipozyten (33) und menschliche Erythrozyten (20) einzudringen vermag.

5.2.3 Stimulierung der K^+ -Aufnahme

Die beobachtete Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)\text{-Aufnahmerate}$ in kultivierte Ratten-Herzzellen (Tab. 6, Abb. 21 und 22 a) und

menschliche Girardi-Herzzellen (Tab. 6 und Abb. 22 b) muß auf eine gesteigerte enzymatische Aktivität der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase zurückgeführt werden, da es (a) zu einer Erhöhung des Zell-Kaliums kommt (Tab. 6 und Abb. 25) und (b) Herzglykoside diese Stimulierung komplett verhindern (Tab. 7 und Abb. 23).

Als Erklärungsmöglichkeit für die gesteigerte Enzymaktivität in Gegenwart von Na_3VO_4 kann eine direkte oder eine indirekte Stimulierung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase diskutiert werden (176):

1. Eine Erhöhung der unspezifischen Permeabilität der Zellmembran durch Vanadat wird für Neuroblastoma-Zellen beschrieben (121). Ionenbewegungen im Sinne eines Ausgleichs der Konzentrationsgradienten hätten einen Anstieg der intrazellulären Na^+ - und eine Senkung der intrazellulären K^+ -Konzentration zur Folge. Unter physiologischen Bedingungen limitiert die intrazelluläre Konzentration an Na^+ -Ionen als Substrat der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase die Aktivität dieses Enzyms und damit die Umsatzrate des gekoppelten $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Transports (Überblick bei (69, 183)).

Wie die Experimente der Abb. 27 zeigen, erhöht Na_3VO_4 den $^{22}\text{Na}^+$ -Einstrom in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen und menschliche Girardi-Zellen. Diese Steigerung des $^{22}\text{Na}^+$ -Influxes - etwa 2 - 5 pMole/mg Protein x min. - gleicht der erhöhten $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate von 2 - 10 nMolen/mg Protein x min. in beiden Zelltypen. Wenn dieser gesteigerte $^{22}\text{Na}^+$ -Einstrom für eine indirekte Stimulierung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase und damit für eine gesteigerte $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme verantwortlich gemacht werden soll, müßte man einen erhöhten intrazellulären Na^+ -Spiegel erwarten. Dies jedoch wurde nicht beobachtet (Tab. 6).

Man kann daher annehmen, daß der gesteigerte $^{22}\text{Na}^+$ -Influx in Gegenwart von Vanadat einen zusätzlichen Effekt, aber nicht die Ursache für die Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme darstellt. Mit der Erhöhung des $^{22}\text{Na}^+$ -Einstroms kann jedenfalls die Tatsache erklärt werden, daß die intrazelluläre Na^+ -Konzentration nicht drastisch abfällt, sondern trotz der Na_3VO_4 -induzierten Stimulierung der Na^+ -Pumpe weitgehend konstant bleibt (Tab. 6).

2. Vanadat stimuliert die Adenylatcyclase in Fraktionen aus Fettzellen (148) bzw. Herzmuskelgewebe (72, 103) und erhöht den intrazellulären c-AMP-Spiegel im Katzen-Myokard (74, 144). In Vogel- bzw. Truthahn-Erythrozyten wird eine durch das Adenylatcyclase-System induzierte Steigerung der K^+ -Aufnahme beobachtet (61, 63). Clausen und Flatman (26) berichten von einer Stimulierung des aktiven Na^+ - K^+ -Transports im Skelettmuskel der Ratte nach β -Sympathomimetika-Gabe. Im Gegensatz zur Wirkung von Na_3VO_4 sind diese Effekte jedoch an Erythrozyten nicht durch g-Strophanthin hemmbar (63). De Sousa und Grosso (31) sehen in ihren in vivo-Experimenten, daß gerade Vanadat zu einer Blockierung der c-AMP-induzierten Stimulierung des Na^+ - und H_2O -Transports über die Froschhaut führt. Im glatten Gefäßmuskel wäre bei erhöhtem c-AMP-Spiegel eine erschlaffende Wirkung zu erwarten; in Gegenwart von Vanadat kommt es jedoch zur Vasokonstriktion (vgl. (135)).
3. Eine weitere, einfache Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte ($^{86}Rb^++K^+$)- bzw. ($^{42}K^+$)-Aufnahmerate wäre ein Co-Transport von Vanadat und $^{86}Rb^+$ bzw. $^{42}K^+$. Dies jedoch scheint aufgrund der unterschiedlichen Aufnahmekinetiken und Transportraten der Verbindungen (Abb. 10 und 25) und der Hemmbarkeit der ($^{86}Rb^+$)-Mehraufnahme durch g-Strophanthin (Tab. 7) unwahrscheinlich.
4. Vanadat oxidiert Katecholamine in vivo (88). Für Katechole und ihre Orthochinone wird eine fast zweifache Stimulierung der aus Frosch-Skelettmuskel isolierten (Na^++K^+)-ATPase, unabhängig von β -adrenergen gekoppelten Adenylatcyclase-System, beschrieben (25). Bis heute existiert jedoch kein experimenteller Hinweis dafür, daß durch Interaktion von Na_3VO_4 mit endogenen Katecholaminen ein besonders wirksames Katecholamin-Derivat entsteht.
5. Was die Vanadat-induzierte Stimulierung der ($^{86}Rb^++K^+$)-Aufnahme anbelangt, sollte die starke Ähnlichkeit zwischen den Wirkungen von Na_3VO_4 und Insulin auf den ($^{86}Rb^++K^+$)-Influx und die zellulären Na^+ - und K^+ -Gehalte beachtet werden (178). Wie bereits für Na_3VO_4 demonstriert (Tab. 6), führt auch Insulin zu einer Erhöhung des intrazellulären K^+ -Spiegels

in Hühner-Herzmuskelzellen (37), myokardialen und fibroblastoiden Rattenherzzellen und menschlichen Girardi-Zellen (alle Tab. 9), begleitet von einer gesteigerten ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate in diesen Zellen (Abb. 29 und Tab. 9). Die intrazellulären Na^+ -Gehalte zeigen sich dagegen nicht signifikant verändert, weder in Gegenwart von Insulin (37) noch von Na_3VO_4 (Tab. 6).

Weitere Ähnlichkeiten zwischen Vanadat und Insulin werden bezüglich Glukose-Oxidation (153) und 2-deoxy-D-(^3H)-Glukose-Aufnahme in Ratten-Adipozyten (33), fibroblastoide bzw. myokardiale Ratten-Herzzellen und menschliche Girardi-Zellen (Abb. 30 und Tab. 9) beobachtet. Allerdings verhält sich nur Vanadium in +IV-wertiger Vanadylform hinsichtlich der Oxidation von Glukose insulinartig (153).

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Insulin-ähnliche Wirkung von Vanadat gibt das Langzeit-Experiment der Abb. 28:

Nach Serum-Entzug kommt es mit zunehmender Inkubationsdauer zu einer Abnahme des K^+ -Einstroms, die jedoch durch Zugabe von Na_3VO_4 - zumindest teilweise - antagonisiert werden kann. In Gegenwart von Serum beobachtet man die Vanadat-induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme interessanterweise nicht mehr.

Ähnliche Wirkungen von Insulin - allerdings hinsichtlich der zellulären Aminosäure-Aufnahme - wurden von Elsas et al. (37) aus Experimenten mit kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen berichtet: 3 Stunden nach Serumentzug war der Transport von 2-Aminoisobuttersäure auf etwa 40 % seines Ausgangswertes abgesunken. Gab man dann Insulin zu, erhöhte sich die Transport-Kapazität innerhalb von 3 Stunden, bis der Kontrollwert wieder erreicht war; in Gegenwart von Serum zeigte sich dagegen für Insulin keine stimulierende Wirkung mehr.

5.2.4 Hypothese der dualistischen Na_3VO_4 -Wirkung

Ausgehend von den dargestellten experimentellen Daten, soll mit der folgenden Hypothese versucht werden, die dualistische Wirkung von Na_3VO_4 auf den aktiven K^+ -Transport und die zellulären K^+ - und Na^+ -Gehalte zu erklären (178, 179):

Entsprechend der jeweiligen Befähigung der Zelle, enzymatisch und/oder nicht-enzymatisch Vanadium (V) in die +IV-wertige Vanadylform zu reduzieren, kann Vanadium in den verschiedenen getesteten Herzzelltypen entweder mehr als Herzglykosid-artiger Inhibitor oder mehr als Insulin-artiger Stimulator der aktiven K^+ -Aufnahme agieren.

Wenn Na_3VO_4 die $(Na^+ + K^+)$ -ATPase inhibiert, ist der Insulin-ähnliche Effekt, der auf einer ungehemmten Aktivität dieses Enzyms beruht, blockiert. Wenn dagegen Vanadat durch Reduktionsvorgänge in Vanadyl übergeführt wird und daher nicht mehr als Hemmer der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase agieren kann, beobachtet man die Insulin-artige Wirkung. Diese Hypothese wird gestützt durch experimentelle Befunde mit Herzzellen, die eine Stimulierung der $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme in Gegenwart von Na_3VO_4 zeigen (Rattenherz-Muskel- und -Nichtmuskelzellen, menschliche Girardi-Herzzellen), und mit Herzzellen, deren $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Einstrom durch Vanadat gehemmt wird (fibroblastoide Meerschweinchen-Herzzellen) (Tab. 9):

Im ersteren Falle beobachtet man parallel zur Na_3VO_4 - und Insulin-induzierten Stimulierung der 2-deoxy-D- (^3H) -Glukose-Aufnahme eine Stimulierung des $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Einstroms; in letzterem Falle (Meerschweinchenherz-Nichtmuskelzellen) erhöht nur Insulin, aber nicht Vanadat, den Hexose-Transport. In fibroblastoiden Hühner-Herzzellen zeigt sich in Gegenwart von Insulin keine Stimulierung des $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Influxes und auch keine Anhebung des intrazellulären K^+ -Spiegels. Deshalb können Experimente mit diesem Zelltyp die oben dargelegte Hypothese einer insulinartigen Wirkung von Na_3VO_4 hinsichtlich einer Stimulierung des aktiven $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Transports weder beweisen noch widerlegen.

Dubyak und Kleinzeller (33) konnten bei Studien mit isolierten Ratten-Adipozyten für Vanadat keinen stimulierenden Effekt auf die aktive $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Aufnahme nachweisen, obwohl im gleichen Experiment durch Vanadat der Transport von 2-deoxy-D- (^3H) -Glukose in die Zelle Insulin-artig stimuliert wurde. Andererseits war es den Autoren nicht möglich, in Gegenwart von Insulin eine eindeutige Stimulierung des $(^{86}Rb^+ + K^+)$ -Einstroms und eine klare Erhöhung des Zell-Kaliums zu finden. Daher kön-

nen diese Befunde die Hypothese einer Insulin-ähnlichen Wirkung von Na_3VO_4 auf die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme in Herzzellen nicht ernsthaft in Frage stellen.

Gegenwärtig werden zwei Denkmodelle diskutiert, die beide die Fähigkeit von Insulin erklären sollen, die Verteilung von Na^+ - und K^+ -Ionen über die Zellmembran empfindlicher Zelltypen zu verändern (Überblick bei (30)):

- a) Modifizierung der Membran-Permeabilität für Na^+ - und K^+ -Ionen in verschiedenem Ausmaß durch Insulin.
- b) Direkte Stimulierung der Na^+ -Pumpe durch Insulin.

Was die Insulin-Wirkung im Herzmuskel betrifft, halten sich aufgrund experimenteller Befunde beide Hypothesen die Waage (30). Bezüglich der Wirkung von Vanadat im Myokard wurde sowohl eine gesteigerte Permeabilität für Na^+ -Ionen (Abb. 27) als auch eine Stimulierung der Na^+ -Pumpe (Tab. 7 und Abb. 23) beobachtet. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist der molekulare Mechanismus der Insulin-ähnlichen Wirkung von Na_3VO_4 unbekannt. Dubyak und Kleinzeller (33) ziehen einen Effekt von Vanadat oder Vanadyl auf Phosphorylierungsvorgänge an Schlüsselproteinen der Zellmembran, die an der Insulin-Wirkung beteiligt sind, in Erwägung.

5.2.5 Na_3VO_4 als endogener Regulator der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ im Myokardgewebe

Ausgehend von den dargestellten experimentellen Daten kann man konstatieren, daß für Na_3VO_4 Voraussetzungen erfüllt sind, als endogener Regulator der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ im Herzgewebe zu agieren: Vanadat vermag in die Zelle einzudringen, es existiert eine begrenzte Anzahl intrazellulärer Bindungsstellen und es vermag die aktive ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme und damit einhergehend das Kontraktionsverhalten der untersuchten Myokardzellen zu modifizieren. Die zur Auslösung der beobachteten Effekte notwendigen Vanadium-Konzentrationen sind niedrig und liegen inner- bzw. oberhalb des physiologischen Bereichs (1×10^{-6} - $1 \times 10^{-9}\text{M}$), wie er für verschiedene Wirbeltier-Gewebe angegeben wird (19, 139, 147).

Hypothesen über den Mechanismus der Regulator-Funktion von

Na_3VO_4 werden von verschiedenen Autoren diskutiert (48, 69). Sie stützen sich dabei hauptsächlich auf Studien an Membranpräparationen der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$, deren Aktivität in vitro durch Vanadat - wie in Anwesenheit von g-Strophanthin - gehemmt wird (21, 68, 124).

Befunde einer Inhibierung des aktiven K^+ -Transportes in Erythrozyten (20), Meerschweinchen-Myokardgewebe (2) und fibroblastoide Herzzellen vom Meerschweinchen bzw. Huhn (Tab. 6 und Abb. 22) in Gegenwart von Na_3VO_4 scheinen die Uniformität einer Vanadat-Wirkung im Sinne einer Reduzierung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ -Aktivität zu bestätigen. Interessanterweise stellt sich jedoch im intakten Gewebe die Beeinflussung der Na^+ -Pumpe durch Na_3VO_4 komplexer dar: In Ratten-Adipozyten (33), Ratten-Aorta (135) und kultivierten Nieren-Epithelzellen (123) bleibt eine Vanadat-induzierte Veränderung der $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ aus. In Rattenherz-Muskelzellen wie Nichtmuskelzellen (Tab. 6, Abb. 21 und 22 a), menschlichen Girardi-Herzzellen (Tab. 6 und Abb. 22 b) und in Ventrikelstreifen aus Rattenmyokard (50) beobachtet man sogar eine Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)\text{-Aufnahme}$. Die Effekte von Na_3VO_4 auf kultivierte Hühner-Herzmuskelzellen (167) und Mäuse-Skelettmuskel (171, Vyskočil et al., persönliche Mitteilung) sind ebenfalls mit einer Stimulierung der Na^+ -Pumpe vereinbar.

Als Schlußfolgerung aus diesen gegenwärtig bekannten Daten muß die regulatorische Wirkung von Vanadat auf die $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ in vivo als komplexer angesehen werden als man ursprünglich aufgrund von in vitro-Resultaten vermutete. Die oben dargestellte Hypothese einer dualistischen, d. h. g-Strophanthin- bzw. Insulin-ähnlichen Wirkung von Vanadium mag helfen, die im intakten Gewebe beobachtete Heterogenität der Vanadat-Effekte auf den aktiven $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Austausch zu verstehen.

5.3 MODIFIZIERUNG DES KONTRAKTIONSVERHALTENS DURCH Na_3VO_4

5.3.1 Positive Chronotropie und Bathmotropie

Die Abb. 16 und 18 zeigen für spontan kontrahierende Ratten-

Herzmuskelzellen in Gegenwart verschiedener Vanadium-Verbindungen eine Zunahme der Automatieneigung und eine Steigerung der Kontraktionsfrequenz. Parallel zu diesen Effekten findet man in denselben Zellen und im gleichen Konzentrationsbereich ($1 \times 10^{-6} \text{ M} - 1 \times 10^{-3} \text{ M Na}_3\text{VO}_4$) eine erhöhte ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate (Abb. 21). Selbstverständlich ist dies noch kein endgültiger Beweis dafür, daß positive Chronotropie und Bathmotropie auf einer Stimulierung des aktiven K^+ -Transports und damit auf einer erhöhten ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität beruhen. Diese Befunde veranschaulichen jedoch, daß Modifizierungen des Kontraktionsverhaltens, wie sie auch in Gegenwart von g-Strophanthin beobachtet werden (76, 102), nicht mit der für Glykoside allgemein diskutierten Inhibierung der Enzymaktivität (1, 13), sondern - im Falle des Vanadats - auch mit einer Stimulierung der Na^+ -Pumpe einhergehen können.

Für Schrittmacher-Zellen besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen Kontraktionsfrequenz und Steilheit der spontanen diastolischen Depolarisation ($f \geq 50/\text{min.}$) (4). Die Membranpotential-Registrierungen der Abb. 9 a und b verdeutlichen, daß durch Erhöhung der Anstiegssteilheit der langsamen diastolischen Depolarisation die Schwelle zur Auslösung eines neuen Aktionspotentials eher erreicht wird und es dadurch schneller zur Auslösung einer erneuten Kontraktion kommt. Ein "Umspringen" von getriebenen Myokardzellen (vgl. Abb. 9 c) zu Schrittmacher-Zellen und umgekehrt wurde in Ratten-Herzmuskelzell-Kulturen beobachtet; dieser Vorgang war immer mit der Entwicklung bzw. dem Verlust spontaner diastolischer Depolarisation, d. h. von Automatieneigung, verbunden (4).

Bei Studien an kultivierten Hühner-Myokardzellen konnte - wie oben postuliert - gleichzeitig mit der g-Strophanthin-induzierten Steigerung der Kontraktionsfrequenz eine Zunahme der langsamen diastolischen Depolarisation registriert werden (102). Aufgrund indirekter Hinweise muß für den positiv chronotropen und bathmotropen Effekt in Gegenwart von Na_3VO_4 ein ähnlicher Mechanismus diskutiert werden:

Der spontanen diastolischen Depolarisation wird eine Verminderung der K^+ -Leitfähigkeit während der Depolarisationsphase und/oder eine Zunahme des langsamen Na^+ - bzw. Ca^{2+} -Einstroms

in die Zelle zugeordnet (166). Vanadat bewirkt eine Stimulierung des Na^+ -Einstroms in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen (Abb. 27). Takeda (165) konnte an partiell depolarisierten Rattenvorhof-Muskelstreifen in Gegenwart von V_2O_5 eine Wiederherstellung der Kontraktionstätigkeit demonstrieren, die er aufgrund weiterer Daten auf einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom bezog (165). Mit diesen Befunden kann die Steigerung von Kontraktionsfrequenz und Automatieneigung spontan kontrahierender Ratten-Myokardzellen in Kultur - wie man sie in Gegenwart von Na_3VO_4 beobachtet (Abb. 16 und 18) - erklärt werden.

5.3.2 Positive Inotropie

Vanadat beeinflusst eine ganze Reihe von Enzymen, die direkt oder indirekt am Kontraktionsprozeß der Herzmuskelzelle beteiligt sind (Überblick bei (150, 161)). Aufgrund welcher Mechanismen es nun durch Na_3VO_4 zum positiv inotropen Effekt am Myokard kommt, kann jedoch derzeit experimentell nicht eindeutig belegt werden. Daher sollen einige Hypothesen, die das momentan verfügbare Wissen über kardiale Effekte von Vanadat weitgehend beinhalten, nachfolgend vorgestellt werden - auch wenn im Rahmen dieser Arbeit nicht zu allen Diskussionspunkten eigene Befunde existieren:

1. Am Tintenfisch-Axon führt Vanadat zu einer Inhibierung des Ca^{2+} -Effluxes (via ATP-getriebene Ca^{2+} -Pumpe) (32). Verschiedene Arbeitsgruppen berichten von einer Hemmung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase aus Skelett- und Herzmuskel in Gegenwart von Vanadat (75, 125, 172, 180). Wenn dies auch für intaktes Myokardgewebe gilt, wäre eine Steigerung der Kontraktionskraft aufgrund des erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels denkbar (vgl. (106)).
2. Vanadat stimuliert die Adenylatcyclase in verschiedenen Geweben (72, 103, 148); dabei wird eine Wechselwirkung mit der Nukleotidbindungsstelle des Enzyms diskutiert (103, 104). Dennoch erscheint es unwahrscheinlich, daß die Modifizierung der Adenylatcyclase-Aktivität durch Vanadat eine Rolle bei der Auslösung positiv inotroper Effekte spielt:
So findet man im intakten Katzenmyokard nach NH_4VO_3 -Einwirkung eine nur geringe Erhöhung des c-AMP-Spiegels im

Vergleich zur Steigerung der Kontraktionskraft (74, 144). Die positiv inotrope Wirkung des Vanadats ist weder durch β -Antagonisten blockierbar (144, 145, 165), noch durch den Phosphodiesterase-Hemmer IBMX potenzierbar (18); eine Steigerung der isometrischen Spannung in Gegenwart von IBMX bzw. Isoprenalin wird durch Zugabe von NH_4VO_3 sogar konzentrationsabhängig zurückgenommen (18).

Am Vorhof des Meerschweinchens wird in Gegenwart von Vanadat ein negativ inotroper Effekt registriert, obwohl die Adenylatcyclase wie im Ventrikelgewebe stimuliert ist (72). Während β -adrenerge Stimulation zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von Troponin I führt, reduziert Vanadium die Anzahl an Querbrücken zu den dünnen Aktin-Filamenten (162), was sich in einer verminderten Steifheit und isometrischen Spannung Glycerin-extrahierter, Detergenz-behandelter Herzmuskel-Fasern äußert (83, 162). Damit kann auch die Inhibierung der myofibrillären ATPase durch Vanadat erklärt werden (161). Alle diese Befunde schließen eine Involvierung des Adenylatcyclase-Systems in der Na_3VO_4 -induzierten Steigerung der myokardialen Kontraktionskraft weitgehend aus.

3. Die Glykosid-ähnliche Inhibierung der isolierten $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase durch Vanadat wird immer wieder mit einer positiv inotropen Wirkung am Myokard in Verbindung gebracht (145). Andererseits gibt es derzeit keinen experimentellen Hinweis dafür, daß es in Gegenwart von Na_3VO_4 gleichzeitig zu einer Hemmung der aktiven K^+ -Aufnahme bzw. des Na^+ -Effluxes und der Entwicklung erhöhter isometrischer Spannung am Herzmuskelpräparat kommt. Akera (2) konnte eine Reduzierung der g-Strophanthin-hemmbareren $^{86}\text{Rb}^+$ -Aufnahme an Meerschweinchen-Vorhofgewebe in Gegenwart von Vanadat demonstrieren, allerdings in Zusammenhang mit einem eindeutig negativ inotropen Effekt. Im Ratten-Papillarmuskel blieb die $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmerate dagegen unbeeinflusst von positiv inotropen V_2O_5 -Konzentrationen (165). Bei Experimenten in unserem Labor mit elektrisch-gereizten Rattenherz-Ventrikelstreifen gelang es ebenfalls nicht, unter in vivo-Bedingungen für Vanadat eine Inhibierung des K^+ -Einstroms in die Zelle nachzuweisen. Im Gegenteil - aber in Übereinstimmung mit Resultaten an spontan kontrahierenden, kultivierten Ratten-Herz-

muskelzellen (Abb. 21), konnte sogar eine konzentrationsabhängige Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme ($\text{IC}_{50} = 5 \times 10^{-4} \text{M Na}_3\text{VO}_4$) bestimmt werden, und zwar genau für den Konzentrationsbereich, in dem Vanadat zu positiver Inotropie führte (50). Diese Befunde werden indirekt durch Untersuchungen an kultivierten Hühner-Herzmuskelzellen (167) und am Mäuse-Skelettmuskel (171, Vyskočil et al., persönliche Mitteilung) bestätigt, die in der Vanadat-induzierten Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials einen Hinweis für eine Stimulierung der ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Aktivität sehen.

Am Ratten-Skelettmuskel wurde eine ähnliche Stimulierung der elektrogenen Na^+ -Pumpe beobachtet, jedoch in Gegenwart von Katecholaminen (26) bzw. Insulin (27). In beiden Fällen kam es - wie in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen für Vanadat gezeigt - zu einer Anhebung des Zellkaliums (vgl. Tab. 6 und 9), einer Reduzierung des intrazellulären Na^+ -Spiegels (vgl. Tab. 6) und einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (vgl. (167, 171)). Während eine Beteiligung β -adrenerger Mechanismen an der myokardialen Vanadat-Wirkung aus verschiedenen Gründen (siehe oben) weitgehend ausgeschlossen werden kann, besteht zwischen der Wirkung von Na_3VO_4 und Insulin noch in einem zusätzlichen Punkt auffallende Ähnlichkeit: Nur in Gegenwart von Insulin zeigte sich eine Stimulierung des Na^+ -Einstroms in die Skelettmuskelzelle (26, 27), wie sie auch für Vanadat in kultivierten Myokardzellen aufgrund elektrophysiologischer Parameter postuliert (167) und nachgewiesen werden konnte (Abb. 27) (178).

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten und diskutierten experimentellen Befunde soll in Anlehnung an die Hypothese einer dualistischen - also einerseits Glykosid- und andererseits Insulin-ähnlichen - Vanadat-Wirkung (vgl. 5.2.4) folgendes Modell einer kardialen Wirkung von Vanadat entwickelt werden:

Liegt Vanadium als +5-wertiges Vanadat vor, beobachtet man - als Resultat einer Interaktion mit ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase-Untereinheiten der cytoplasmatischen Zellmembran-Seite - eine Di-

gitalis-ähnliche Auslösung des positiv inotropen Effekts. Wird dagegen Vanadat im Zellinneren zu +4-wertigem Vanadyl reduziert, tritt eine Insulin-ähnliche Wirkung ein. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der Glukose-Aufnahmerate (Abb. 30 und Tab. 9) sowie gleichzeitig zu einer Stimulierung des aktiven Natrium-Kalium-Transportes (Abb. 21 und 23, Tab. 7) mit konsekutiver Anhebung des K^+ - Na^+ -Quotienten (Tab. 6). Durch welchen genauen Mechanismus es letztlich zum positiv inotropen Effekt kommt, ist derzeit jedoch weder für Na_3VO_4 noch für Insulin (52) experimentell belegbar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Verbindungen des essentiellen Spurenelements Vanadium (86) zeigen am Myokard eine positiv inotrope Wirkung (73). Kultivierte myokardiale und fibroblastoide Herzzellen verschiedener Spezies wurden verwendet, um unter in vivo-Bedingungen Aufnahme und intrazelluläre Anreicherung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ (Vanadat) sowie die Wirkung von Vanadat auf Na^+ - und K^+ -Aufnahme, zelluläre Na^+ - und K^+ -Gehalte, Morphologie und Kontraktionsverhalten dieser Zellen zu studieren.

1. Die Aufnahme von Vanadat in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen erfolgt energieunabhängig durch ein spezifisches sättigbares Transportsystem ($K_M \approx 70 \mu\text{M}$, $V_{\text{Max}} \approx 200 \text{ pMole/mg Protein} \times \text{min. bei } 37^\circ\text{C}$), das mit einer "erleichterten Diffusion" vereinbar ist. Im Zellinneren beobachtet man eine gegenüber dem Extrazellulärraum bis zu 100fache Anreicherung von Vanadium. Die intrazelluläre Bindung von Vanadium wird durch einen gekrümmten Scatchard Plot beschrieben, d. h. es existiert mehr als eine Bindungsstelle. Maximal werden $(3 - 27) \times 10^9 \text{ Na}_3\text{VO}_4$ -Moleküle pro Zelle gebunden.
2. In spontan kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen zeigt Vanadat eine positiv chrono-, bathmo- und inotrope Wirkung. Erste Effekte beobachtet man bei $1 \times 10^{-7} \text{ M Na}_3\text{VO}_4$; Konzentrationen $> 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ verursachen toxische Wirkungen (Arrhythmien, Fibrillieren und Stillstand der Kontraktions-tätigkeit, jedoch keine Kontraktur der Zelle).
3. Die Wirkung von Vanadat auf den K^+ -Influx und die intrazellulären Kationen-Gehalte ist abhängig vom untersuchten Zelltyp:
In fibroblastoiden Herzzellen embryonaler Hühner bzw. neonataler Meerschweinchen findet man in Gegenwart von Na_3VO_4 ($1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$) eine g-Strophanthin-artige Inhibierung der K^+ -Aufnahme (bis zu 50 %), verbunden mit einer Senkung des Zell-Kaliums (bis zu 20 %).
Dagegen wird in Muskel- und Nichtmuskelzellen aus den Herzen neonataler Ratten sowie in menschlichen Girardi-Herzzellen eine Na_3VO_4 -induzierte Steigerung der K^+ -Aufnahme

(bis zu 100 %) beobachtet, die mit einer Erhöhung des zellulären K^+ -Gehaltes (bis zu 20 %) einhergeht. Eine signifikante Veränderung des Zell-Natriums bleibt aus.

4. In vitro-Experimente mit angereicherten Membran-Präparationen der $(Na^+ + K^+)$ -ATPase zeigen - Spezies- und Organ-unabhängig - eine uniforme Inhibierung des Enzyms. Dagegen muß die Stimulierung des K^+ -Einstroms auf eine Stimulierung der Na^+ -Pumpe zurückgeführt werden, da sie g-Strophanthin-hemmbar ist.
5. In Gegenwart von Na_3VO_4 (1×10^{-4} - $1 \times 10^{-3}M$) wird für kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen sowie menschliche Girardi-Herzzellen eine geringe Steigerung der $^{22}Na^+$ -Aufnahme (ca. 5 - 30 %) gemessen.
6. In kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur findet man nach Serum-Entzug (bis zu 24 Std.) eine Verminderung der K^+ -Aufnahmerate, ein Abfallen des zellulären K^+ -Spiegels und eine Senkung von Kontraktionsfrequenz und Automatieneigung. Diese Effekte können - zumindest teilweise - durch Zugabe von Na_3VO_4 ($10^{-4}M$) antagonisiert werden.
7. Korrelierend mit der gegensätzlichen Wirkung von Vanadat und g-Strophanthin auf den K^+ -Transport und -Gehalt kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen, verhindert Na_3VO_4 in diesen Zellen die typischen morphologischen Veränderungen, wie sie nach alleiniger Gabe hoher, cytotoxischer g-Strophanthin-Dosen eintreten.
8. In myokardialen und fibroblastoiden Ratten-Herzzellen und Girardi-Herzzellen können die stimulierenden Effekte von Vanadat auf K^+ -Einstrom und zellulären K^+ -Gehalt durch Insulin (10 mU/ml) imitiert werden. In denselben Zelltypen bewirken Na_3VO_4 wie Insulin eine Stimulierung der 2-deoxy-D-Glukose-Aufnahme.
9. Aus den experimentellen Daten wird die Hypothese einer dualistischen, d. h. g-Strophanthin- bzw. Insulin-ähnlichen Wirkung von Na_3VO_4 auf den K^+ -Transport unterschiedlicher kultivierter Herzzellen abgeleitet: Nur Vanadium als +V-wertiges Vanadat gilt als wirksamer Hemmer der isolierten

($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase (22), während +IV-wertiges Vanadyl Insulinartig die Glukose-Oxidation in Ratten-Adipozyten stimuliert (153). Da in lebenden Systemen eine Überführung von V^{V} in V^{IV} nachgewiesen wurde, kann die enzymatische und/oder nicht-enzymatische Oxidoreduktion von Vanadium-Verbindungen im Zellinneren als verantwortlich angesehen werden für das Vorherrschen entweder der Inhibierung oder der Stimulierung der Na^+ -Pumpe durch Vanadat bzw. Vanadyl in den untersuchten Herzzelltypen.

10. Die Ergebnisse befürworten eine mögliche Rolle des Spurenelementes Vanadium als endogener Regulator des aktiven Kationenflusses im Herzgewebe. Die Wirkung von Vanadat auf die ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase ausschließlich im Sinne eines Herzglykosidähnlichen Effekts zu interpretieren (vgl. (145)), muß angesichts der gezeigten in vivo-Befunde revidiert und zugunsten des komplexeren dualistischen Denk-Modells modifiziert werden.

7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1 Spontan kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur (300fache Vergrößerung im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop)	3
Abb. 2 Präparation von Ratten-Herzmuskelzellen (schematische Darstellung)	5
Abb. 3 Ausbeute an Muskel- und Nicht-Muskelzellen in den Trypsinierungsschritten einer Ratten-Herzmuskelzell-Präparation (kumulierte relative Häufigkeit)	6
Abb. 4 Verschiedene Präparations- und Kultivierungs-Stadien kontrahierender Herzmuskelzellen (Elektronenmikroskopische Aufnahmen)	8
Abb. 5 Kultivierte Hühnerherz-Nichtmuskelzellen (300fache Vergrößerung im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop)	11
Abb. 6 Menschliche Girardi-Herzzellen in Kultur (300fache Vergrößerung im umgekehrten Phasenkontrast-Mikroskop)	12
Abb. 7 Elektrooptisches System zur Registrierung von Kontraktionen kultivierter Herzmuskelzellen (schematische Darstellung)	14
Abb. 8 Möglichkeiten der Analyse von Hormon- bzw. Pharmakon-Wirkungen in kultivierten, kontrahierenden Herzmuskelzellen (schematische Darstellung)	23
Abb. 9 Kennzeichnung verschiedener Typen kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen durch Membranpotentiale	26
Abb. 10 Kinetiken der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen	33
Abb. 11 Konzentrationsabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen	35
Abb. 12 Temperaturabhängigkeit der $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen (Arrhenius Plot)	37
Abb. 13 Intrazelluläre Bindung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen (Scatchard Plot)	41
Abb. 14 Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionstätigkeit einer einzelnen Ratten-Herzmuskelzelle (Zeitabhängigkeit)	44
Abb. 15 Zeitabhängigkeit der Na_3VO_4 -Wirkung auf die Kontraktionsfrequenz einer einzelnen kultivierten Ratten-Herzmuskelzelle	45
Abb. 16 Einfluß von Na_3VO_4 auf die Kontraktionstätigkeit kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen (Konzentrationsabhängigkeit)	46

	<u>Seite</u>
Abb. 17 Wirkungen von Na_3VO_4 und g-Strophanthin auf kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen: Morphologische Aspekte	48
Abb. 18 Einfluß von Na_3VO_4 auf Kontraktionsverhalten und ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen. Vergleich mit verschiedenen Vanadium- und Nicht-Vanadium-Verbindungen	49
Abb. 19 Konzentrationsabhängige Inhibierung der Ratten-Herz-ATPase-Aktivität durch Na_3VO_4 und g-Strophanthin	52
Abb. 20 Kinetiken der ($^{42}\text{K}^+$)- bzw. ($^{86}\text{Rb}^+$)-Aufnahme in kultivierte, kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin	53
Abb. 21 Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur (Konzentrationsabhängigkeit)	54
Abb. 22 Konzentrationsabhängige Stimulierung bzw. Inhibierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme durch Na_3VO_4 bei unterschiedlichen Herzzelltypen	57
Abb. 23 Konzentrationsabhängige Verhinderung der Na_3VO_4 -induzierten Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahme kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen durch g-Strophanthin	59
Abb. 24 Einfluß der Kontraktionsfrequenz kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen auf die Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate	61
Abb. 25 Zeitabhängige Aufnahme von $^{86}\text{Rb}^+$ in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin	64
Abb. 26 Kinetiken der ^{22}Na -Aufnahme in kontrahierende Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur. Einfluß von g-Strophanthin	66
Abb. 27 Kinetiken der $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen in Abwesenheit und Anwesenheit von g-Strophanthin. Einfluß von Na_3VO_4	67
Abb. 28 Langzeit-Wirkungen von Na_3VO_4 auf Kontraktionsfrequenz, Automatieneigung, ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate und zellulären K^+ -Gehalt in kontrahierenden Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur	70
Abb. 29 Konzentrationsabhängige Stimulierung der ($^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+$)-Aufnahmerate kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen in Kultur durch Insulin. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin	73
Abb. 30 Kinetiken der 2-deoxy-D- (^3H) -Glukose-Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen und Girardi-Herzzellen. Einfluß von Na_3VO_4 und Insulin	74
Abb. 31 Scheme of the fate of vanadate at the cardiac cell membrane	82

	<u>Seite</u>
Tab. 1 Energiereiche Phosphate in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen	30
Tab. 2 $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Aufnahme in kultivierte Ratten-Herzmuskelzellen. Konkurrenz mit verschiedenen Vanadium-Verbindungen	38
Tab. 3 Intrazelluläre Anreicherung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen	39
Tab. 4 Intrazelluläre Anreicherung von $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ in kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen. Anreicherungsfaktoren und maximale Anzahl an Bindungsstellen/Zelle	40
Tab. 5 $\text{Na}_3^{48}\text{VO}_4$ -Anreicherung und $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen. Einfluß der Hitze-Denaturierung	42
Tab. 6 Zelluläre K^+ - und Na^+ -Gehalte und $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahmeraten in verschiedenen kultivierten Herzzelltypen. Einfluß von Na_3VO_4 und g-Strophanthin	55
Tab. 7 Einfluß von g-Strophanthin auf die Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme kontrahierender Ratten-Herzmuskelzellen und menschlicher Girardi-Herzzellen in Kultur	58
Tab. 8 Einfluß von D 600 und Tetrodotoxin auf die Na_3VO_4 -induzierte Stimulierung der $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Aufnahme kultivierter Ratten-Herzmuskelzellen	68
Tab. 9 Vergleich der Wirkungen von Insulin und Na_3VO_4 auf $(^{86}\text{Rb}^+ + \text{K}^+)$ -Einstrom, 2-deoxy-D- (^3H) -Glukose-Aufnahme und intrazellulären K^+ -Gehalt bei verschiedenen kultivierten Herzzelltypen	75

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. AKERA, T., OLGAARD, M. K., TEMMA, K., BRODY, T. M.:
Development of the positive inotropic action of ouabain:
Effects of transmembrane sodium movement.
J. Pharmacol. Experm. Therapeutics 203, 675 - 684 (1977)
2. AKERA, T., TAKEDA, K., YAMAMOTO, S.:
Effects of vanadate on Na^+ , K^+ -ATPase and on the force
of contraction in guinea-pig hearts.
Life Sciences 25, 1803 - 1812 (1979)
3. AKERA, T.:
Effects of cardiac glycosides on Na^+ , K^+ -ATPase.
In: Cardiac Glycosides, part I: Experimental Pharmacology,
herausgegeben von Greeff, K., Springer Verlag Berlin New
York, 287 - 336 (1981)
4. ATHIAS, P., FRELIN, C., GROZ, B., DUMAS, J. P., KLEPPING,
J., PADIEU, P.:
Myocardial electrophysiology: Intracellular studies on
heart cell cultures from newborn rats.
Path. Biol. 27, 13 - 19 (1979)
5. ATHIAS, P., GROZ, B., SURVILLE, J. M., KLEPPING, J.:
Simultaneous record of mechanical and electrical activi-
ties of rat heart cells in culture.
Biol. Cell. 37, 131 - 136 (1980)
6. BARRY, W. H., PITZEN, R., PROTAS, K., HARRISON, D. C.:
Inotropic effects of different calcium ion concentrations
on the embryonic chick ventricle.
Circ. Res. 36, 727 - 734 (1975)
7. BEAUGÉ, L. A. und GLYNN, I. M.:
A modifier of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in commercial ATP.
Nature 268, 355 - 356 (1977)
8. BEAUGÉ, L. A. und GLYNN, I. M.:
Commercial ATP containing traces of vanadate alters the
response of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase to external potassium.
Nature 272, 551 - 552 (1978)
9. BEAUGÉ, L. A. und DIPOLLO, R.:
Vanadate selectively inhibits the K_0^+ -activated Na^+ efflux
in squid axons.
Biochim. Biophys. Acta 551, 220 - 223 (1979)
10. BEAUWENS, R., CRABBÉ, J., RENTMEESTERS, M.:
Effects of vanadate on the functional properties of the
isolated toad bladder.
J. Physiol. 310, 293 - 305 (1981)
11. BENTFELD, M., LÜLLMANN, H., PETERS, T., PROPPE, D.:
Interdependence of ion transport and the action of ouabain
in heart muscle.
Br. J. Pharmac. 61, 19 - 27 (1977)
12. BERNARD, P. und COURAUD, F.:
Electrophysiological studies on embryonic heart cells in
culture. Scorpion toxin as a tool to reveal latent fast
sodium channel.
Biochim. Biophys. Acta 553, 154 - 168 (1979)

13. BIEDERT, S., BARRY, W. H., SMITH, T. W.:
Inotropic effects and changes in sodium and calcium contents associated with inhibition of monovalent cation active transport by ouabain in cultured myocardial cells. *J. Gen. Physiol.* 74, 479 - 494 (1979)
14. BLONDEL, B., ROIJEN, J., CHENEVAL, J. P.:
Heart cells in culture: A simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27, 356 - 358 (1971)
15. BODER, G. B., HARLEY, R. J., JOHNSON, I. S.:
Recording system for monitoring automaticity of heart cells in culture. *Nature* 231, 531 - 532 (1971)
16. BODER, G. B., und JOHNSON, I. S.:
Comparative effects of some cardioactive agents on automaticity of cultured heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 4, 453 - 463 (1972)
17. BOND, G. H., HUDGINS, P. M.:
Kinetics of inhibition of Na, K-ATPase by Mg^{2+} , K^{+} , and vanadate. *Biochemistry* 18, 325 - 331 (1979)
18. BRÜCKNER, R., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H., SCHUMACHER, A., ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., WERDAN, K.:
Negativ inotropic effect of vanadate in ventricular myocardium in the presence of 3-isobutyl-1-methylxanthin or isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 315, 147 - 153 (1980)
19. CANTLEY, L.C., Jr., JOSEPHSON, L., WARNER, R., YANAGISAWA, M., LECHENE, C., GUIDOTTI, G.:
Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252, 7421 - 7423 (1977)
20. CANTLEY, L. C., Jr., RESH, M. D., GUIDOTTI, G.:
Vanadate inhibits the red cell (Na^{+} , K^{+}) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 272, 552 - 554 (1978)
21. CANTLEY, L. C., Jr., CANTLEY, L. G., JOSEPHSON, L.:
A characterization of vanadate interactions with the (Na, K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 253, 7361 - 7368 (1978)
22. CANTLEY, L. C., Jr., AISEN, P.:
The fate of cytoplasmic vanadium. *J. Biol. Chem.* 254, 1781 - 1784 (1979)
23. CHACKO, S.:
DNA synthesis, mitosis, and differentiation in cardiac myogenesis. *Develop. Biol.* 35, 1 - 18 (1973)
24. CHARNEY, A. N., SILVA, P., EPSTEIN, F. H.:
An in vitro inhibitor of Na-K-ATPase present in an adenosinetriphosphate preparation. *J. Appl. Physiol.* 39, 156 - 158 (1975)

25. CHENG, L. C., ROGUS, E. M., ZIERLER, K.:
Catechol, a structural requirement for $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase stimulation in rat skeletal muscle membrane.
Biochim. Biophys. Acta 464, 338 - 346 (1977)
26. CLAUSEN, T. und FLATMAN, J. A.:
The effect of catecholamines on Na-K transport and membrane potential in rat soleus muscle.
J. Physiol. 270, 383 - 414 (1977)
27. CLAUSEN, T. und KOHN, P. G.:
The effect of insulin on the transport of sodium and potassium in rat soleus muscle.
J. Physiol. 265, 19 - 42 (1977)
28. CSETE, L., AUCLAIR, M. C., LECHAT, P.:
Chronotropic effects of histamine on cultured neonatal rat heart cells.
Eur. J. Pharmacol. 58, 117 - 123 (1979)
29. CUTILLETIA, A. F., AUMONT, M. C., NAG, A. C., ZAK, R.:
Separation of muscle and non-muscle cells from adult rat myocardium: An application to the study of RNA polymerase.
J. Mol. Cell. Cardiol. 9, 399 - 407 (1977)
30. CZECH, M. P.:
Molecular basis of insulin action.
Ann. Rev. Biochem. 46, 359 - 384 (1977)
31. DE SOUSA, R. C. und GROSSO, A.:
Vanadate blocks cyclic AMP-induced stimulation of sodium and water transport in amphibian epithelia.
Nature 279, 803 - 804 (1979)
32. DI POLO, R., ROJAS, H. R., BEAUGÉ, L.:
Vanadate inhibits uncomplexed Ca efflux but not Na-Ca exchange in squid axons.
Nature 281, 228 - 229 (1979)
33. DUBYAK, G. R. und KLEINZELLER, A.:
The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes.
J. Biol. Chem. 255, 5306 - 5312 (1980)
34. ECKEL, J. und REINAUER, H.:
Characteristics of insulin receptors in the heart muscle. Binding of insulin to isolated muscle cells from adult rat heart.
Biochim. Biophys. Acta 629, 510 - 521 (1980)
35. EISALO, A., KAHRI, A., KARPPINEN, K., MANNINEN, V.:
Transport of ^{22}Na and ^{86}Rb tracer ions in isolated contracting heart cells exposed to lignocaine.
Cardiovasc. Res. 7, 809 - 812 (1973)
36. EKMAN, A., MANNINEN, V., SALMINEN, S.:
Ion movements in red cells treated with propranolol.
Acta Physiol. Scand. 75, 333 - 344 (1969)
37. ELSAS, L. J., WHEELER, F. B., DANNER, D. J., DE HAAN, R. L.:
Amino acid transport by aggregates of cultured chicken heart cells. Effect of insulin.
J. Biol. Chem. 250, 9381 - 9390 (1975)

38. ERDMANN, E. und SCHONER, W.:
Ouabain receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations from different tissues and species. I. Determinations of kinetic constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 307, 386 - 398 (1973)
39. ERDMANN, E. und SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 302 - 315 (1973)
40. ERDMANN, E. und SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations. III. On the stability of the ouabain receptor against physical treatment, hydrolases and SH reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 316 - 324 (1973)
41. ERDMANN, E. und SCHONER, W.:
Ouabain-receptor interactions in ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 283, 335 - 356 (1974)
42. ERDMANN, E. und SCHONER, W.:
Eigenschaften des Receptors für Herzglykoside. *Klin. Wschr.* 52, 705 - 718 (1974)
43. ERDMANN, E. und HASSE, W.:
Quantitative aspects of ouabain binding to human erythrocyte and cardiac membranes. *J. Physiol.* 251, 671 - 682 (1975)
44. ERDMANN, E.:
Cell membrane receptors for cardiac glycosides in the heart. *Basic Res. Cardiol.* 72, 315 - 325 (1977)
45. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., PHILIPP, G., HACKBARTH, I., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H.:
Stimulatory effect of vanadate on ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity and on ^3H -ouabain-binding in a cat heart cell membrane preparation. *Nature* 278, 459 - 461 (1979)
46. ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., PHILIPP, G., HACKBARTH, I., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H., CRANE, F. L.:
Purified cardiac cell membranes with high ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity contain significant NADH-vanadate reductase activity. *Nature* 282, 335 - 336 (1979)
47. ERDMANN, E., PHILIPP, G., SCHOLZ, H.:
Cardiac glycoside receptor, ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity and force of contraction in rat heart. *Biochem. Pharmacol.* 29, 3219 - 3229 (1980)
48. ERDMANN, E.:
Cardiac effects of vanadate. *Basic Res. Cardiol.* 75, 411 - 412 (1980)

49. ERDMANN E., WERDAN, K., KRAWIETZ, W., LEBUHN, M.,
CHRISTL, S.:
Significance of NADH-vanadate-oxidoreductase of cardiac
and erythrocyte cell membranes.
Basic Res. Cardiol. 75, 460 - 465 (1980)
50. ERDMANN, E., PHILIPP, G., WERDAN, K., KRAWIETZ, W.:
Effects of vanadate on isolated cell membranes, cultured
beating myocardial cells and ventricular strips of rat
heart.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, Suppl., R 37
(1980)
51. ERDMANN, E.:
Influence of cardiac glycosides on their receptor:
In: Cardiac Glycosides, part I: Experimental Pharmacology,
herausgegeben von Greeff, K., Springer Verlag Berlin
New York, 337 - 380 (1981)
52. FARAH, A. E. und ALOUSI, A. A.:
The actions of insulin on cardiac contractility.
Life Sciences 29, 975 - 1000 (1981)
53. FARMER, B. B., HARRIS, R. A., JOLLY, W. W., HATHAWAY,
D. R., KATZBERG, A., WATANABE, A. M., WHITLOW, A. L.,
BESCH, H. R., Jr.:
Isolation and characterization of adult rat heart cells.
Arch. Biochem. Biophys. 179, 545 - 558 (1977)
54. FISHMAN, D. A. und MOSCONA, A. A.:
An electron microscope study of in vitro dissociation
and reaggregation of embryonic chick and mouse heart
cells.
J. Cell. Biol. 43, 37 A (1969)
55. FOSSET, M., DE BARRY, J., LENOIR, M. C., LAZDUNSKI, M.:
Analysis of molecular aspects of Na^+ and Ca^{2+} uptakes
by embryonic cardiac cells in culture.
J. Biol. Chem. 252, 6112 - 6117 (1977)
56. FRAENKEL, A., THAUER, R.:
Strophanthintherapie. Zugleich ein Beispiel quantita-
tiver Digitalisanwendung nach pharmakologischen Grund-
sätzen.
Springer Verlag Berlin (1933)
57. FRELIN, C.:
Amino acid metabolism by new-born rat heart cells in
monolayer cultures.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 479 - 491 (1980)
58. FRELIN, C.:
Some aspects of energy metabolism in new born rat heart
cell cultures.
Biol. Cell. 37, 173 - 176 (1980)
59. FREYSS-BEGUIN, M., VAN BRUSSEL, E., MATHIEU-LEVY, N.,
SIMONIN, G., LECHAT, P.:
Fatty acid metabolism and beating rate of cultured heart
cells derived from 3, 6 and 9 day-old rats.
Biochimie 60, 803 - 807 (1978)

60. FRIEDMAN, I., SCHWALB, H., HELLAQ, H., PINSON, A.,
HELLER, M.:
Interactions of cardiac glycosides with cultured cardiac
cells. II. Biochemical and electron microscopic studies
on the effects of ouabain on muscle and non-muscle cells.
Biochim. Biophys. Acta 598, 272 - 284 (1980)
61. FURUKAWA, H., BILEZIKIAN, J. P., LOEB, J. N.:
Effects of ouabain and isoproterenol on potassium influx
in the turkey erythrocyte. Quantitative relation to li-
gand binding and cyclic AMP generation.
Biochim. Biophys. Acta 598, 345 - 356 (1980)
62. GALPER, J. B. und CATTERALL, W. A.:
Developmental changes in the sensitivity of embryonic
heart cells to tetrodotoxin and D 600.
Develop. Biol. 65, 216 - 227 (1978)
63. GARDNER, J. D., KIINO, D. R., JOW, N., AURBACH, G. D.:
Effects of extracellular cations and ouabain on cate-
cholamine-stimulated sodium and potassium fluxes in
turkey erythrocytes.
J. Biol. Chem. 250, 1164 - 1175 (1975)
64. GIRARDI, A. J., WARREN, J., GOLDMAN, C., JEFFRIES, B.:
Growth and CF antigenicity of measles virus in cells
deriving from human heart.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 18 - 22 (1958)
65. GLYNN, I. M. und KARLISH, S. J. D.:
The sodium pump.
Ann. Rev. Physiol. 37, 13 - 55 (1975)
66. GOSHIMA, K.:
Further studies on preservation of the beating rhythm of
myocardial cells in culture.
Exptl. Cell. Res. 92, 339 - 349 (1975)
67. GOSHIMA, K.:
Arrhythmic movements of myocardial cells in culture and
their improvement with anti-arrhythmic drugs.
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 217 - 238 (1976)
68. GRANTHAM, J. J., GLYNN, I. M.:
Renal Na, K-ATPase: Determinants of inhibition by vanadium.
Am. J. Physiol. 236, F 530 - F 535 (1979)
69. GRANTHAM, J. J.:
The renal sodium pump and vanadate.
Am. J. Physiol. 239, F 97 - F 106 (1980)
70. GRIFFATON, G., FREYSS-BEGUIN, M., VAN BRUSSEL, E.,
LOWY, R.:
Evaluation of the redox state and energy level in cultured
rat heart cells.
Biol. Cell. 37, 167 - 172 (1980)
71. GROSSE-BROCKHOFF, F., HAUSAMEN, T. U.:
200 Jahre Herztherapie mit Digitalis.
Dtsch. Med. Wschr. 100, 1980 - 1991 (1975)

72. GRUPP, G., GRUPP, I. JOHNSON, C. L., WALLICK, E. T.,
SCHWARTZ, A.:
Effects of vanadate on cardiac contraction and adenylate
cyclase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 440 - 447 (1979)
73. HACKBARTH, I., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H., ERDMANN, E.,
KRAWIETZ, W., PHILIPP, G.:
Positive inotropism of vanadate in cat papillary muscle.
Nature 275, 67 (1978)
74. HACKBARTH, I., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H., WETZEL, E.,
ERDMANN, E., KRAWIETZ, W., PHILIPP, G.:
Stimulatory effect of vanadate on cyclic AMP levels in
cat papillary muscle.
Biochem. Pharmacol. 29, 1429 - 1432 (1980)
75. HAGENMEYER, A., WIERICHS, R., BADER, H.:
Vanadate inhibition of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic
reticulum from pig heart.
Basic Res. Cardiol. 75, 452 - 454 (1980)
76. HALLE, W. und JENTZSCH, K. D.:
Aktuelle Probleme der Wirkstoff-Forschung. 6. Mitteilung:
Zur Verwendung tierischer Zell- und Gewebekulturen für
die Erforschung und Aufklärung biologischer Substanzwir-
kungen - Pharmakologische Untersuchungen an Herzzellen.
Die Pharmazie 29, 433 - 442 (1974)
77. HANSEN, O., JENSEN, J., NORBY, J. G., OTTOLENGHI, P.:
A new proposal regarding the subunit composition of
($\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$)-ATPase.
Nature 280, 410 - 412 (1979)
78. HARARY, I. und FARLEY, B.:
In vitro studies on single beating rat heart cells.
II. Intercellular communication.
Experim. Cell Res. 29, 466 - 474 (1963)
79. HARARY, I. und SATO, E.:
Studies in vitro on single beating heart cells. V. Changes
in adenosine-triphosphate-induced contractions of ex-
tracted models.
Biochim. Biophys. Acta 82, 614 - 616 (1964)
80. HARARY, I., MC CARL, R., FARLEY, B.:
Studies in vitro on single beating rat heart cells. IX.
The restoration of beating by serum lipids and fatty acids.
Biochim. Biophys. Acta 115, 15 - 22 (1966)
81. HARARY, I., HOOVER, F., FARLEY, B.:
The isolation and cultivation of rat heart cells.
Methods Enzymol. 32, 740 - 745 (1974)
82. HEALY, G. M. und PARKER, R. C.:
An improved chemically defined basal medium (CMRL - 1415)
for newly explanted mouse embryo cells.
J. Cell. Biol. 30, 531 - 538 (1966)
83. HERZIG, J. W., PETERSON, J. W., RÜEGG, J. C., SOLARO, R. J.:
Vanadate and phosphate ions reduce tension and increase
cross-bridge kinetics in chemically skinned heart muscle.
Biochim. Biophys. Acta 672, 191 - 196 (1981)

84. HOELZL-WALLACH, D. F. und KNÜFERMANN, H. G.:
Plasmamembranen - Chemie, Biologie und Pathologie.
Springer Verlag Berlin New York (1973)
85. HOFFMAN, J. F.:
The red cells membrane and the transport of sodium and
potassium.
Am. J. Med. 41, 666 - 680 (1966)
86. HOPKINS, L. L. und MOHR, H. E.:
Vanadium as an essential nutrient.
Fed. Proc. 33, 1773 - 1775 (1974)
87. HUDGINS, P. M. und BOND, G. H.:
(Mg²⁺+K⁺)-dependent inhibition of NaK-ATPase due to a
contaminant in equine muscle ATP.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1024 - 1029 (1977)
88. HUDGINS, P. M. und BOND, G. H.:
Reversal of vanadate inhibition of NaK-ATPase by cate-
cholamines.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 23, 313 - 326 (1979)
89. JACKSON, D. E.:
The pharmacological action of vanadium.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 3, 477 - 514 (1912)
90. JOHNSON, J. L., COHEN, H. J., RAJAGOPALAN, K. V.:
Studies of vanadium toxicity in the rat, lack of correla-
tion with molybdenum utilization.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 940 - 946 (1974)
91. JOSEPHSON, I., RENAUD, J. F., VOGEL, S., MC LEAN, M.,
SPERELAKIS, N.:
Mechanism of the histamine-induced positive inotropic
action in cardiac muscle.
Eur. J. Pharmacol. 35, 393 - 398 (1976)
92. JOSEPHSON, L. und CANTLEY, L. C., Jr.:
Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated
muscle.
Biochemistry 16, 4572 - 4578 (1977)
93. KARSTEN, U., KÜSSLER, A., JANISZEWSKI, E., WOLLENBERGER, A.:
Influence of variations in pericellular oxygen tension on
individual cell growth, muscle-characteristic proteins,
and lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in cultures
of beating rat heart cells.
In vitro 9, 130 - 146 (1973)
94. KASTEN, F. H.:
Electron microscope studies of the combined effects of
trypsinization and centrifugation on rat heart cells,
with observation of early cultures.
J. Cell. Biol. 31, 131 A (1966)
95. KASTEN, F. H.:
Mammalian myocardial cells.
In: Tissue culture - methods and applications, herausge-
geben von Kruse, P. F., Jr. und Patterson, M. K., Jr.;
Academic Press New York, 72 - 81 (1973)

96. KAUFMANN, R., TRITTHART, H., RODENROTH, S., ROST, B.:
Das mechanische und elektrische Verhalten isolierter
embryonaler Herzmuskelzellen in Zellkulturen.
Pflügers Arch. 311, 25 - 49 (1969)
97. KAUMANN, A. J., WITTMANN, R., BIRNBAUMER, L., HOPPE, B. H.:
Activation of myocardial β -adrenoceptors by the nitrogen-
free low affinity ligand 3, 4-dihydroxy- α -methylpropio-
phenone (U - 0521).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 296, 217 - 228
(1977)
98. KHAN, M. M. T. und MARTELL, A. E.:
Kinetics of metal ion and chelate catalyzed oxidation
of ascorbic acid. III. Vanadyl ion catalyzed oxidation.
J. Amer. Chem. Soc. 90, 6011 - 6017 (1968)
99. KIMELBERG, H. K.:
Active potassium transport and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity
in cultured glioma and neuroblastoma cells.
J. Neurochem. 22, 971 - 976 (1974)
100. KIMELBERG, H. K. und MAYHEW, E.:
Cell growth and ouabain-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ uptake and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -
ATPase activity in 3T3 and SV40 transformed 3T3 fibro-
blasts.
Biochim. Biophys. Acta 455, 865 - 875 (1976)
101. KOIDL, B., TRITTHART, H. A., ERKINGER, S.:
Cultured embryonic chick heart cells: Photometric measure-
ment of the cell pulsation and the effects of calcium ions,
electrical stimulation and temperature.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 165 - 178 (1980)
102. KOIDL, B. und TRITTHART, H. A.:
The effects of ouabain on the electrical and mechanical
activities of embryonic chick heart cells in culture.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 663 - 673 (1980)
103. KRAWIETZ, W., WERDAN, K., ERDMANN, E.:
Stimulatory effect of vanadate on the adenylate cyclase
of cardiac tissue.
Biochem. Pharmacol. 28, 2517 - 2520 (1979)
104. KRAWIETZ, W., WERDAN, K., ERDMANN, E.:
Stimulation of human cardiac adenylate cyclase by vanadate.
Basic Res. Cardiol. 75, 433 - 437 (1980)
105. KUSTIN, K., LIU, S. T., NICOLINI, C., TOPPEN, D. L.:
Interaction of catechol and catechol derivatives with
dioxovanadium (V). I. Kinetics of complex formation in
acidic media.
J. Amer. Chem. Soc. 96, 7410 - 7415 (1974)
106. LANGER, G. A.:
Effects of digitalis on myocardial ionic exchange.
Circulation 46, 180 - 187 (1972)
107. LAU, Y. H., ROBINSON, R. B., ROSEN, M. R., BILEZIKIAN,
J. P.:
Subclassification of β -adrenergic receptors in cultured
rat cardiac myoblasts and fibroblasts.
Cir. Res. 47, 41 - 48 (1980)

108. LEE, K. S. und KLAUS, W.:
The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides.
Pharmacol. Rev. 23, 193 - 261 (1971)
109. LEFKOWITZ, R., O'HARA, D., WARSHAW, J. B.:
Surface interaction of (³H)-norepinephrine with cultured chick embryo myocardial cells.
Biochim. Biophys. Acta 332, 317 - 328 (1974)
110. LOVE, W. D. und BURCH, G. E.:
A comparison of potassium ⁴², rubidium ⁸⁶, and cesium ¹³⁴ as tracers of potassium in the study of cation metabolism of human erythrocytes in vitro.
J. Lab. Clin. Med. 41, 351 - 362 (1953)
111. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
112. MACARA, I. G., KUSTIN, K., CANTLEY, L. C., Jr.:
Glutathione reduces cytoplasmic vanadate, mechanism and physiological implications.
Biochim. Biophys. Acta 629, 95 - 106 (1980)
113. MACARA, I. G.:
Vanadium - an element in search of a role.
Trends in Biochem. Sciences 5 (4), 92 - 94 (1980)
114. MASSON-PEVET, M., JONGSMA, H. J., DE BRUIJNE, J.:
Collagenase- and trypsin-dissociated heart cells: A comparative ultrastructural study.
J. Mol. Cell. Cardiol. 8, 747 - 757 (1976)
115. MATSUI, H. und SCHWARTZ, A.:
Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na⁺+K⁺)-dependent ATPase from cardiac tissue.
Biochim. Biophys. Acta 151, 655 - 663 (1968)
116. MC CALL, D.:
Responses of cultured heart cells to procainamide and lignocaine.
Cardiovasc. Res. 12, 529 - 536 (1978)
117. MC CALL, D.:
Cation exchange and glycoside binding in cultured rat heart cells.
Am. J. Physiol. 236, C 87 - C 95 (1979)
118. MC DONALD, T. F. und DE HAAN, R. L.:
Ion levels and membrane potential in chick heart tissue and cultured cells.
J. Gen. Physiol. 61, 89 - 109 (1973)
119. MEISCH, H. U. und BIELIG, H. J.:
Chemistry and biochemistry of vanadium.
Basic Res. Cardiol. 75, 413 - 417 (1980)
120. MOLSTAD, P., BOHMER, T., EIKLID, K.:
Specificity and characteristics of the carnitine transport in human heart cells (CCL 27) in culture.
Biochim. Biophys. Acta 471, 296 - 304 (1977)

121. MONTERO, M. R., GUERRI, C., GRISOLIA, S.:
Vanadate, alcohol or both increase passive membrane permeability of Neuro-2a-cells; lesser sensitivity of Hep-2 cells.
Life Sciences 28, 641 - 646 (1981)
122. MULLER, P.:
Potassium and rubidium exchange across the surface membrane of cardiac Purkinje fibres.
J. Physiol. 177, 453 - 462 (1965)
123. MULLIN, J. M., DIAMOND, L., KLEINZELLER, A.:
Effects of ouabain and ortho vanadate on transport-related properties of the LLC-PK₁ renal epithelial cell line.
J. Cell. Physiol. 105, 1 - 6 (1980)
124. NECHAY, B. R. und SAUNDERS, J. P.:
Inhibition by vanadium of sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase derived from animal and human tissues.
J. Environment. Pathol. Toxicol. 2, 247 - 262 (1978)
125. O'NEAL, S. G., RHOADS, D. B., RACKER, E.:
Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and other ATPases.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 845 - 850 (1979)
126. PAPPANO, A. J.:
Pharmacology of heart cells during ontogenesis.
In: Advances in General and Cellular Pharmacology, Vol. 1; herausgegeben von Narahashi, T. und Bianchi, C. P., Plenum Press New York London, 83 - 144 (1975)
127. PARIS, S., SAMUEL, D., JACQUES, Y., GACHE, C., FRANCHI, A., AILHAND, G.:
The role of serum albumin in the uptake of fatty acids by cultured cardiac cells from chick embryo.
Eur. J. Biochem. 83, 235 - 243 (1978)
128. PERRONE, J. R. und BLOSTEIN, R.:
Asymmetric interaction of inside-out and right-side-out erythrocyte membrane vesicles with ouabain.
Biochim. Biophys. Acta 291, 680 - 689 (1973)
129. PINSON, A., DESGRES, J., HELLER, M.:
Partial and incomplete oxidation of palmitate by cultured beating cardiac cells from neonatal rats.
J. Biol. Chem. 254, 8331 - 8335 (1979)
130. POPE, M. T. und DALE, B. W.:
Isopoly-vanadates, -niobates, and -tantallates.
Q. Rev. Chem. Soc. 22, 527 - 548 (1968)
131. POST, R. L., HUNT, D. P., WALDERHAUG, M. O., PERKINS, R. C., PARK, J. H., BETH, A. H.:
Vanadium compounds in relation to inhibition of sodium and potassium adenosine triphosphatase.
In: Proceedings 2nd International Conference on the Properties and Functions of Na, K-ATPase, herausgegeben von Skou, J. C. und Norby, J. G., Academic Press New York, 389 - 401 (1979)

132. QUIST, E. E. und HOKIN, L. E.:
The presence of two ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase inhibitors in equine muscle ATP: Vanadate and a dithioerythritol-dependent inhibitor.
Biochim. Biophys. Acta 511, 202 - 212 (1978)
133. RAMASARMA, T., MC KELLAR, W. C., CRANE, F. L.:
Vanadate-stimulated NADH-oxidation in plasma membrane.
Biochim. Biophys. Acta, 646, 88 - 98 (1981)
134. RANDLE, P. J. und TUBBS, P. K.:
Carbohydrate and fatty acid metabolism.
In: Handbook of Physiology, Section 2: The Cardiovascular System, Vol. I The Heart; herausgegeben von Berne, R. M., Sperelakis, N., Geiger, S. R., American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 805 - 844 (1979)
135. RAPP, J. P.:
Aortic responses to vanadate: Independence from (Na , K)-ATPase and comparison of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats.
Hypertension 3 (suppl. 1), 168 - 172 (1981)
136. REITER, M.:
The positive inotropic action of cardiac glycosides on cardiac ventricular muscle.
In: Cardiac Glycosides, part I: Experimental Pharmacology, herausgegeben von Greeff, K., Springer Verlag Berlin New York, 187 - 220 (1981)
137. REPKE, K. und PORTIUS, H. J.:
Über die Identität der Ionenpumpen-ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym.
Experientia 19, 452 - 459 (1963)
138. ROSENTHAL, M. D. und WARSHAW, J. B.:
Fatty acid and glucose oxidation by cultured rat heart cells.
J. Cell. Physiol. 93, 31 - 40 (1977)
139. RUBINSON, K. A.:
Concerning the form of biochemically active vanadium.
Proc. R. Soc. London B 212, 65 - 84 (1981)
140. RUMMEL, W., BIELIG, H. J., FORTH, W., PFLEGER, K., RÜDIGER, W., SEIFEN, E.:
Absorption and accumulation of vanadium by tunicates.
Protides of the Biological Fluids 14, 205 - 210 (1966)
141. SAKURAI, H., SHIMOMURA, S., FUKUZAWA, K., ISHIZU, K.:
Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 293 - 298 (1980)
142. SCATCHARD, G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949)
143. SCHATZMANN, H. J.:
Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium- und Natriumtransport durch die Erythrozytenmembran.
Helv. Physiol. Acta 11, 346 - 354 (1953)

144. SCHMITZ, W., HACKBARTH, I., SCHOLZ, H., WETZEL, E.:
Effects of vanadate on the c-AMP system of the heart.
Basic Res. Cardiol. 75, 438 - 443 (1980)
145. SCHOLZ, H., HACKBARTH, I., SCHMITZ, W., WETZEL, E.:
Effect of vanadate on myocardial force of contraction.
Basic Res. Cardiol. 75, 418 - 422 (1980)
146. SCHONER, W., VON ILBERG, C., KRAMER, R., SEUBERT, W.:
On the mechanism of Na^+ - and K^+ -stimulated hydrolysis
of adenosine triphosphate. 1. Purification and proper-
ties of a Na^+ - and K^+ -activated ATPase from ox brain.
Eur. J. Biochem. 1, 334 - 343 (1967)
147. SCHROEDER, H. A., BALASSA, J. J., TIPTON, I. H.:
Abnormal trace metals in man - vanadium.
J. Chron. Dis. 16, 1047 - 1071 (1963)
148. SCHWABE, U., PUCHSTEIN, C., HANNEMANN, H., SÖCHTIG, E.:
Activation of adenylate cyclase by vanadate.
Nature 227, 143 - 145 (1979)
149. SCHWARTZ, A., LINDENMAYER, G., ALLEN, J. C.:
The sodium- potassium adenosine triphosphatase: pharma-
cological, physiological, and biochemical aspects.
Pharmacol. Rev. 27, 3 - 134 (1975)
150. SCHWARTZ, A., ADAMS, R. J., GRUPP, I., GRUPP, G., HOLROYDE,
M. J., MILLARD, R. W., SOLARO, R. J., WALLICK, E. T.:
Effects of vanadate on myocardial function.
Basic Res. Cardiol. 75, 444 - 451 (1980)
151. SCHWARZ, K. und MILNE, D. B.:
Growth effects of vanadium in the rat.
Science 174, 426 - 428 (1971)
152. SERAYDARIAN, M. W., ARTAZA, L., ABBOTT, B. C.:
Creatine and the control of energy metabolism in cardiac
and skeletal muscle cells in culture.
J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 405 - 413 (1974)
153. SHECHTER, Y. und KARLISH, S. J. D.:
Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat
adiopocytes by vanadyl (IV) ions.
Nature 284, 556 - 558 (1980)
154. SIMONS, T. J. B.:
Vanadate - a new tool for biologists.
Nature 281, 337 - 338 (1979)
155. SINCLAIR, A. J., MILLER, H. A., HARRISON, D. C.:
An electrooptical monitoring technique for heart cells
in tissue culture.
J. Appl. Physiol. 29, 747 - 749 (1970)
156. SKOU, J. C.:
The influence of some cations on an adenosine triphos-
phatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta 23, 349 - 401 (1957)
157. SKOU, J. C.:
Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across
cell membranes.
Physiol. Rev. 45, 596 - 617 (1965)

158. SKOU, J. C.:
The relationship of the ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-activated enzyme system to transport of sodium and potassium across the cell membranes.
Bioenergetics 4, 1 - 30 (1973).
159. SMITH, J. B. und ROZENGURT, E.:
Serum stimulates the $\text{Na}^+ \text{K}^+$ pump in quiescent fibroblasts by increasing Na^+ entry.
Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 5560 - 5564 (1978)
160. SOBOLL, S., WERDAN, K., BOSZIK, M., MÜLLER, M., ERDMANN, E., HELDT, H. W.:
Distribution of metabolites between mitochondria and cytosol of cultured fibroblastoid rat heart cells.
FEBS Letters 100, 125 - 128 (1979)
161. SOLARO, R. J., HOLROYDE, M. J., WANG, T., MATLIB, M. A., GRUPP, I., GRUPP, G., SCHWARTZ, A.:
Effects of vanadate on biochemical and contractile properties of rabbit hearts.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 2, 445 - 452 (1980)
162. SOLARO, R. J., HOLROYDE, M. J., HERZIG, J. W., PETERSON, J.:
Cardiac relaxation and myofibrillar interactions with phosphate and vanadate.
Eur. Heart J. 1 (suppl. A), 21 - 27 (1980)
163. SPERELAKIS, N.:
Electrical properties of embryonic heart cells.
In: Electrical Phenomena in the Heart, herausgegeben von de Mello, W. C., Academic Press New York London, 1 - 62 (1972)
164. STRAUB, W.:
Die Elementarwirkung der Digitalis-Körper.
S.-B. phys.-med. Ges. Würzb. Jahrg. 1907, 85 - 93 (1908)
165. TAKEDA, K., AKERA, T., YAMAMOTO, S., SHIEH, I. S.:
Possible mechanism for inotropic actions of vanadate in isolated guinea pig and rat heart preparations.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314, 161 - 170 (1980)
166. TRAUTWEIN, W.:
Elektrophysiologie der Herzmuskelfaser.
Ergebn. Physiol. 51, 131 - 198 (1961)
167. TRITTHART, H. A., KOIDL, B., WINDISCH, H.:
Effects of vanadate on action potentials and tension development in papillary muscles and cultured heart muscle cells.
Basic Res. Cardiol. 75, 472 - 477 (1980)
168. TSAI, J. S. und CHEN, A.:
Thyroid hormones: Effect of physiological concentrations on cultured cardiac cells.
Science 194, 202 - 204 (1976)
169. VERNIMMEN, C. und AUCLAIR, M. C.:
Transmembrane potential recordings in monolayers of newborn rat heart cells.
Biol. Cell. 37, 143 - 148 (1980)

170. VYSKOČIL, F., TEISINGER, J., DLOUHA, H.:
A specific enzyme is not necessary for vanadate-induced oxidation of NADH.
Nature 286, 516 - 517 (1980)
171. VYSKOČIL, F., TEISINGER, J., DLOUHA, H.:
The disparity between effects of vanadate (V) and vanadyl (IV) ions on $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ and $\text{K}^+ - \text{phosphatase}$ in skeletal muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 982 - 986 (1981)
172. WANG, T., TSAI, L. I., SOLARO, R. J., GRASSI DE GENDE, A. O., SCHWARTZ, A.:
Effects of potassium on vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ from dog cardiac and rabbit skeletal muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 356 - 361 (1979)
173. WARBANOW, W.:
The effect of prostaglandins E_1 and $\text{F}_2 \propto$ upon the mechanical activity of isolated rat heart muscle cells in culture.
Acta Biol. Med. 35, 1167 - 1168 (1976)
174. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOSZIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Wirkung von Vanadationen in kontrahierenden, kultivierten Ratten-Herzmuskelzellen: Vanadataufnahme und Beeinflussung des Rubidiumflusses über die Zellmembran sowie des Kontraktionsverhaltens.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 360, 398 - 399 (1979)
175. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOSZIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Effects of vanadate in cultured rat heart muscle cells. Vanadate transport, intracellular binding and vanadate-induced changes in beating and in active cation flux.
Biochim. Biophys. Acta 597, 364 - 383 (1980)
176. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., BOSZIK, M., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Regulation of active cation flux by vanadate in beating rat heart muscle cells in culture.
Basic Res. Cardiol. 75, 466 - 471 (1980)
177. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Heterogeneity of vanadate action on active $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{transport}$ in cardiac cells of different species.
Eur. J. Cell Biol. 22, S. 1404 (1980)
178. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., FISCHER, B., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E., SCHMITZ, W., SCHOLZ, H.:
Stimulatory (insulin-mimetic) and inhibitory (ouabain-like) action of vanadate on potassium uptake and cellular sodium and potassium in heart cells in culture.
Biochim. Biophys. Acta 687, 79 - 93 (1982)
179. WERDAN, K., BAURIEDEL, G., KRAWIETZ, W., ERDMANN, E.:
Inhibitory and stimulatory effects of vanadate on sodium pump of cultured heart cells from different species. III. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ Symposium New Haven, Aug. 81, im Druck (1982)

180. WIERICHS, R., HAGENMEYER, A., BADER, H.:
Influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the vanadate inhibition
of the Ca^{2+} -ATPase from pig heart sarcoplasmic reticulum.
Biochim. Biophys. Res. Commun. 92, 1124 - 1129 (1980)
181. WITHERING, W.:
An account of the foxglove, and some of its medical uses;
with practical remarks on dropsy, and other diseases.
Birmingham (1785)
182. WOLTERMANN, G. M., SCOTT, R. A., HAIGHT, G. P., Jr.:
On the coupling of adenosine triphosphate hydrolysis
to a simple inorganic redox system: VO_2^{2+} H_2O_2 .
J. Amer. Chem. Soc. 96, 7569 - 7570 (1974)
183. YAMAMOTO, S., AKERA, T., BRODY, T. M.:
Sodium influx rate and ouabain-sensitive rubidium uptake
in isolated guinea pig atria.
Biochim. Biophys. Acta 555, 270 - 284 (1979)
184. ZIERLER, K. L.:
Insulin, ions, and membrane potentials.
In: Handbook of Physiology. Endocrinology. Washington,
D. C.: Am. Physiol. Soc., sect. 7, vol. 1, chapt. 22,
347 - 368 (1971)

DANKSAGUNG

Herrn Dr. K. Werdan schulde ich für ständiges Interesse, wertvolle Anregungen und Diskussionsbeiträge im Rahmen dieser Arbeit größten Dank, ebenso meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. E. Erdmann für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Frl. B. Fischer und Fr. M. Boszik danke ich für ihre engagierte Mitarbeit, Herrn Dr. K. Lehner, Anatomisches Institut der Universität Regensburg, für die elektronenmikroskopischen Zell-Aufnahmen sowie Herrn PD Dr. B. Koidl, Institut für Med. Physik und Biophysik der Universität Graz, Österreich, für die freundliche Überlassung der Membranpotential-Ableitungen.

Herrn Prof. Dr. H. Scholz, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg, danke ich für das kritische Lesen des Manuskriptes, Frl. U. Bayer für das Schreiben der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 31. Mai 1955 wurde ich in Nürnberg als Kind des Dipl.-Kfm. Walter Bauriedel und seiner Ehefrau Rosmarie, geb. Güntsche, geboren.

- | | | | |
|----------|---|------|---|
| 1961 | - | 1965 | Volksschule an der Schleißheimer Straße, München |
| 1965 | - | 1973 | Oskar-von-Miller-Gymnasium, München |
| 1973 | - | 1975 | Thomas-Mann-Gymnasium, München |
| | | 1975 | Ablegen der Reifeprüfung |
| 1975 | - | 1982 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| | | 1977 | Ablegen des Physikums |
| 1978 | - | 1981 | Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, Labor PD Dr. Erdmann |
| 1980 | - | 1981 | Im Rahmen des Praktischen Jahres Ausbildung an der Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses München-Neuperlach und der Geburtshilflich-Gynäkologischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Rosenheim |
| Frühjahr | | 1982 | Ablegen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung und Approbation |

